

Identifikace řasy *Prototheca* spp. pomocí multiplexní qPCR a testování citlivosti *Prototheca bovis* k amfotericinu B, nystatinu a flukonazolu

Monika Morávková¹, Romana Bačová¹, Monika Beinhauerová¹, Marcela Klimešová²,
Růžena Seydlová², Ivana Kucharovičová³

¹Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., ²Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.,

³Státní veterinární ústav Jihlava

Úvod

Prototheca spp. jsou jednobuněčné achlorofylní řasy, které se většinou vyskytují ve vlhkém prostředí bohatém na organické látky. Některé druhy (*P. bovis*, *P. ciferrii*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, *P. cutis* a *P. miyajii*) jsou považovány za oportunní patogeny lidí a zvířat. Nejčastější formou prototékové infekce je mastitidní onemocnění skotu, které může způsobovat chovateli významné ekonomické ztráty (1). U lidí je prototékoza považována za sporadické, obtížně léčitelné onemocnění způsobující kožní léze, bursitidy a diseminovanou či systémovou infekci (2).



Cíl

Cílem této studie byla přesná identifikace suspektních izolátů *Prototheca* spp. pocházejících z bazénových vzorků kravského mléka pomocí molekulární metody qPCR a u vybraných kmenů zjištění citlivosti k antifungálním látkám.

Materiál a metodika

- Celkem 45 suspektních izolátů *Prototheca* spp. získaných z bazénových vzorků mléka z České republiky v průběhu let 2019-2021 bylo identifikováno dvěma multiplexními systémy qPCR pro identifikaci vybraných druhů prototék (*P. bovis*, *P. blaschkeae*, *P. ciferrii* a *P. wickerhamii*) s vnitřní kontrolou inhibice (3). Kultivace probíhala na Sabouraudově glukózovém agaru při 30°C po dobu 48-72h. Lyzát byl připraven kombinací přístroje Magnalyser (6400 rpm/min), varu 100°C/5 min a centrifugace 14000 rpm/5 min.
- Citlivost k amfotericinu B (0,008-16 mg/L), nystatinu (0,008-16 mg/l) a flukonazolu (0,062 – 128 mg/L) byla testována u 15 vybraných izolátů *P. bovis* pomocí mikrodiluční metody pro testování citlivosti k antifungálním látkám u kvasinek (EUCAST v 7.3.2.; 4).

Výsledky

- Z 45 suspektních izolátů prototék, 41 bylo identifikováno jako *P. bovis*, tři izoláty byly identifikovány jako *P. blaschkeae* a jeden izolát byl určen jako *P. ciferrii*.
- Minimální inhibiční koncentrace (MIC) u *P. bovis* k amfotericinu se pohybovala v rozmezí 0,25 - 1 mg/L, k nystatinu 1 - 2 mg/L a flukonazolu 32 - >128 mg/L. Dále byly stanoveny MIC50 a MIC90 viz. Tabulka 1.

Antimykotikum	Počet izolátů	Počet izolátů s MIC (mg/L)												MIC50 (mg/L)	MIC90 (mg/L)	
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128			
AmphotericinB	15		4	2	8	1									1	1
Nystatin	15				6	9									2	2
Flukonazol	15									1	2	3	9		>128	>128

Závěr

Na základě molekulární analýzy bylo zjištěno, že 91 % izolátů z bazénových vzorků mléka patří do druhu *P. bovis*, což je nejčastější původce prototékové mastitidy skotu. Ačkoliv prototéková infekce skotu je v současné době považovaná za nevléčitelné onemocnění, lidská prototékoza se léčí chirurgickým zásahem a antifungálními látkami např. amfotericinem nebo azoly s různým stupněm úspěšnosti (5). Výsledky testování citlivosti k amfotericinu, nystatinu a k flukonazolu ukazují, že většina izolátů *P. bovis* vykazuje vysoké MIC k flukonazolu s MIC50 >128 mg/L oproti tomu MIC50 pro amfotericin byla 1 mg/L a MIC50 pro nystatin 2 mg/L.

Literatura

- (1) Libisch, B., Picot, C., Ceballos-Garzon, A., Moravkova, M., Klimesová, M., Telkes, G., Le Pape, P. (2022). *Prototheca* Infections and Ecology from a One Health Perspective. *Microorganisms*, 10(5), 938.
- (2) Lass-Flörl, C., Mayr, A. (2007). Human protothecosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 230-242.
- (3) Bacova, R., Kralik, P., Kucharovicova, I., Seydlova, R., Moravkova, M. (2021). A novel TaqMan qPCR assay for rapid detection and quantification of pro-inflammatory microalgae *Prototheca* spp. in milk samples. *Medical Mycology*, 59(8), 784-792.

(4) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2020). EUCAST Definitive document E. Def 7.3. 2. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts.

(5) McMullan, B., Pollett, S., Biswas, C., Packham, D. (2016). Successful treatment of cutaneous protothecosis with liposomal amphotericin and oral itraconazole. *Medical mycology case reports*, 12, 21-23.