METODIKA DETEKCE HOUBOVÝCH ALERGENŮ Z OVZDUŠÍ SE ZAMĚŘENÍM NA ROD *ALTERNARIA*

Jana Palicová, Veronika Dumalasová, Ondřej Zelba, Alena Hanzalová, Martina Trávníčková, Jana Chrpová

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
2021

Dedikace
Metodika je výsledkem řešení projektu CZ.07.1.02/0.0/0.0/17_049/0000830 s názvem Komercializace nových výsledků zemědělského výzkumu VÚRV, v.v.i. pro zlepšení životního prostředí v hlavním městě Praze (Koncept 1: Záchyt a determinace mikroskopických hub v ovzduší hlavního města Prahy) a institucionálního projektu MZE-RO0418.

Publikaci bylo Ministerstvem zemědělství České republiky uděleno osvědčení č. MZE-68703/2021-18133 o uznání uplatněné metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“. O uplatnění byla uzavřena smlouva s Ministerstvem zemědělství ČR.

Oponenti
RNDr. Alena Kubátová, CSc., Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova
Mgr. Iva Křížková, Ph.D., Ministerstvo zemědělství ČR

Autoři
Mgr. Jana Palicová, Ph.D.
RNDr. Veronika Dumalasová, Ph.D.
Ing. Ondřej Zelba
Mgr. Alena Hanzalová, Ph.D.
Ing. Martina Trávníčková
Ing. Jana Chrpová, CSc.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507
161 06 Praha 6

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2021

ISBN 978-80-7427-359-9

OBSAH

I. CÍL METODIKY 1
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY 2
1. ÚVOD 2
1.1. Aerobiologie 3
1.2. Mikroskopické houby v ovzduší 4
1.3. Zástupci rodu *Alternaria* 5
2. PRACOVNÍ POSTUPY 5
2.1. Odběr vzorků vzduchu 5
2.2. Kvantitativní a kvalitativní vyhodnocení 7
2.3. Příklad aplikace metody 7
2.3.1. Vnější ovzduší 7
2.3.2. Vnitřní ovzduší 10
2.4. Molekulární detekce rodu *Alternaria* a alergenu Alt a 1 11
2.4.1. Příprava vzorků DNA 11
2.4.2. PCR detekce rodu *Alternaria* 12
2.4.3. PCR detekce skupiny *Alternaria alternata* 13
2.4.4. Detekce alergenu Alt a 1 pomocí specifických PCR primerů Alta1CF a Alta1CR s využitím cDNA 14
2.4.5. Detekce genu pro alergen Alt a 1 pomocí specifických PCR primerů Alta1CF a Alta1CR s využitím genomové DNA 16
2.4.6. Sekvenování 18
III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ 19
IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY 20
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY 20
VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 21
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE 23

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky bylo vytvořit a popsat nový postup při odběru vzorků vzduchu pro analýzu mikroskopických vláknitých hub (mikromycetů, laicky plísní) ve vnějším a vnitřním prostředí se zaměřením na alergenní rod *Alternaria*. Součástí metodiky je i postup využitelný při přípravě vzorků pro molekulární detekci zástupců rodu *Alternaria* a alergenu Alt a 1.

Zástupci rodu *Alternaria* patří mezi původce černí obilnin, které se objevují v klasech v období dozrávání či žních při zvýšených dešťových srážkách. Takto kontaminované osivo je problém zejména u ječmene, kdy dochází ke znehodnocení sladu. Zároveň jsou zástupci rodu *Alternaria* významnými alergeny a producenty mykotoxinů. Při zpracování zemědělských plodin kontaminovaných houbami rodu *Alternaria* mohou být v zemědělských provozech zvýšené koncentrace spor, což může u citlivých jedinců vyvolat alergickou reakci. Proto je důležité disponovat snadnou a rychlou metodou pro monitoring mikroskopických hub v atmosféře i ve vzduchu vnitřních prostor.

Metodika se opírá o výsledky dvouletých pozorování vzdušné mykoflóry hlavního města Prahy a vybraných vnitřních prostor. Na základě popsaných postupů je možné operativně vyhodnotit rizikovost jakéhokoli vnitřního či vnějšího prostředí pro citlivé i zdravé jedince. Většina izolátů rodu *Alternaria* z ovzduší Prahy patří do skupiny *Alternaria alternata*, jejíž zástupci mohou produkovat mykotoxiny a alergeny s různými důsledky pro potravinářství, zemědělství i zdravotnictví. Nejvýznamnějším alergenem druhu *A. alternata* je Alt a 1, který je rizikovým faktorem pro rozvoj astmatu. Součástí metodiky je také popis molekulární detekce alergenu Alt a 1.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. ÚVOD

Spory mikroskopických vláknitých hub patří spolu s pylovými zrny ke vzdušným alergenům, které mohou při vyšších koncentracích vyvolat u citlivých jedinců alergickou reakci. Dříve byli postiženi především pracovníci v zemědělství, dnes se tato onemocnění vyskytují hojně i ve městech, kde hraje velkou roli znečištění vzduchu prachem, mikročásticemi z automobilových výfuků a jinými polutanty. Ukazuje se, že se tyto částice mohou spojovat s klasickými alergeny (pylová zrna, spory) a silně zvyšovat jejich agresivitu. Za aspirabilní frakci prašného aerosolu jsou považovány částice menší než 10 µm, které jsou vdechovány a ulpívají na sliznici horních cest dýchacích nebo pronikají až do dolních cest dýchacích, kde vyvolávají dráždění, alergie či rozsáhlá respirační onemocnění. Množství spor v atmosféře a druhové spektrum se mění nejen během roku, ale i v průběhu dne. V našich podmínkách je období největšího výskytu spor i následných alergií mezi dubnem a zářím. Ve standardních alergologických kožních testech jsou obsaženy také inhalační alergeny: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* (prick testy – Alyostal).

Alergie je nepřiměřená reakce imunitního systému, která se projeví po kontaktu organismu s různými látkami v okolním prostředí, které nejsou pro organismus nebezpečné, tzv. alergeny. Existují různé typy alergií. Velmi častá je inhalační alergie, kdy se alergen do těla dostává vdechnutím. Jedná se o pyly, roztoče, prach, zvířecí alergeny (peří, srst), bakterie, léky, plísně a další látky. V současné době je věnována velká pozornost alergii na pyl. Již v roce 1873 anglický lékař Blackley, který sám trpěl pylovou alergií, začal zkoumat výskyt pylů ve vzduchu. V různých výškách nad zemí umístil sklíčka pokrytá lepem, na která se pylová zrna zachycovala. Své výzkumy zakončil úspěšným provedením prvních provokačních inhalačních testů s pyly a sporami hub. První pylové monitorovací stanice byly založeny v USA (1936) a Kanadě (1959). Jejich přístroje pracovaly na gravimetrickém principu a ještě neumožňovaly přesnější standardizaci v hodnocení výsledků. Ta se výrazně zlepšila až po vytvoření Hirstova volumetrického lapače (1952), vývoji přesnějších měřících přístrojů a stanovení standardních zásad pro volumetrické analýzy. Od šedesátých let se v Evropě velmi rychle rozšiřuje síť stanic pylové informační služby. V roce 1988 zahájila činnost Centrální evropská pylová databanka ve Vídni (European Aeroallergen Network Server - EANS), do které v současné době přispívá přes 250 stanic pylové služby z celé Evropy. V ČR je celkem 12 stanic Pylové informační služby (PIS), z toho 11 stanic je v trvalém provozu.

Česká pylová informační služba zařazuje do svých pravidelných monitorovacích zpráv v pylové sezóně nejen množství pylových zrn v ovzduší, ale také množství spor nejfrekventovanějších rodů mikroskopických hub (plísní), kterými jsou *Alternaria, Cladosporium, Epicoccum, Helminthosporium* a *Stemphylium*. Odběry vzorků z venkovního vzduchu jsou prováděny pomocí volumetrického lapače pylu firmy Burkard.

1.1. AEROBIOLOGIE

Aerobiologie se zabývá organickými částicemi, jako jsou bakterie, spory hub, pylová zrna, velmi malý hmyz a viry, které jsou pasivně transportovány vzduchem. Při studiu vzdušné mykobioty jsou užívány nejrůznější metody a přístroje. Volba metody je závislá na tom, zda jsou odebírány vzorky z vnitřního či vnějšího vzduchu, jaká je koncentrace mikroorganismů ve vzduchu, životaschopnost a typ mikroorganismů a na mnoha dalších faktorech (Booth et al. 1971, Mouilleseaux 1990). Nejjednodušší metoda je **sedimentační** (gravitační), která využívá schopnost mikroorganismů sedimentovat na pevné povrchy (Klánová 2002). Petriho miska s agarovým médiem je exponována na vzduchu po určitý časový interval a po kultivaci jsou hodnoceny kolonie mikroorganismů. Sedimentace je však vysoce selektivní a poskytuje výhody těžším sporám, pro monitoring částic menších než 30 μm v ovzduší není vhodná (Šimordová 1978). Tato metoda by měla být využita pouze pro identifikaci druhů přítomných v ovzduší a ne pro jejich kvantitativní určení (Burge et Solomon 1987 sec. Juozaitis et al. 1994).

V současné době jsou pro odběry ovzduší častěji používané metody aktivního nasávání vzduchu (Klánová 2002). Přístroje nasávající vzduch, jehož proud naráží přímo na pevný povrch, jako je např. přilnavý povrch krycího sklíčka, agarové médium v Petriho misce nebo na filtr, se nazývají **impaktory**. Tato metoda je použitelná pouze pro omezený počet mikroorganismů ve vzduchu. Jejich vysoké koncentrace totiž výrazně ztěžují práci s odebranými vzorky (odečítání jednotlivých kolonií apod.), a tím také snižují přesnost získaných výsledků. Při vysokých koncentracích mikroorganismů je výhodnější použít **impingery**, které sbírají vzdušné partikule do kapaliny a vzorek může být zředěn na potřebnou úroveň (Booth et al. 1971, Juozaitis et al. 1994).

Mezi ostatní metody odběru vzduchu řadí Booth a kol. (1971) například **filtraci**. Tato metoda je dobře známá, byla používána již Pasteurem. Vzduch, který je nasáván speciálním přístrojem, prochází filtrem, na němž jsou zachycovány mikroorganismy (Flannigan 1992). Po expozici jsou filtry přeneseny na povrch nebo do sterilního média (Mouilleseaux 1990). Mohou být však také umístěny do sterilní vody a třepány, aby se zachycené houbové částice uvolnily do vody, tato suspenze spor je pak přenesena na agarové

médium (Miller et al. 1988). Během filtrace však často dochází k dehydrataci zachycovaných mikroorganismů, a tak je narušena jejich biologická aktivita a jejich detekce je tudíž obtížná (DeCosemo 1992 sec. Juozaitis et al. 1994).

Mikroorganismy ve vzduchu jsou obvykle kvantifikovány buď přímým počítáním pomocí mikroskopu, nebo kultivační metodou (Fišar et al. 1990). Mikroskopické počítání vyžaduje barvení mikroorganismů, kultivační metoda spočívá v zachycování mikroorganismů a neživých částeček na vhodné médium a následné kultivaci vzorků aerosolu na agarových plotnách. Většina autorů, kteří používají kultivační metodu, neztotožňuje počet vyrostlých kolonií s počtem spor ve vzduchu, ale používá termínu **CFU** („colony forming units“), což označuje jednotky, které jsou schopné vytvořit kolonii. Tento termín je přesnější, protože skutečný počet spor ve vzduchu je větší než počet narostlých kolonií.

Stewart a kol. (1995) studovali mikrobiální stres způsobený dopadem mikroorganismů na agarovou plochu při použití impaktoru. S rostoucí rychlostí proudu vzduchu v přístroji a zároveň s rostoucí rychlostí dopadu částic výrazně klesá procento životaschopných mikroorganismů. Kvantitativní výsledky měření jsou pak výrazně zkreslené.

1.2. MIKROSKOPICKÉ HOUBY V OVZDUŠÍ

Spory hub jsou přítomny ve venkovním ovzduší (outdoor) po celý rok, jejich počet a typy se mění s denní dobou, počasím, sezónou, geografickou polohou a s přítomností lokálních zdrojů spor (Beffa et al. 1995). Vzduch z venkovního prostředí a s ním i mikroskopické houby se dostávají do vnitřních prostor (indoor) okny, dveřmi, ventilací, klimatizací, ale i jako kontaminace stavebních materiálů, přírodnin, potravin atd. Pokud v budově po dostatečnou dobu existují podmínky se zvýšenou vlhkostí, může dojít k růstu hub a sporulaci (Shelton et al. 2002). Venkovní vzduch je často dominantním zdrojem vnitřních mikromycetů, porozumění venkovním populacím hub v různých ročních obdobích a v různých oblastech je proto zásadní pro interpretaci výsledků vnitřního vzorkování hub. Právě mikromycety uvnitř budov jsou častou příčinou zdravotních obtíží citlivých pacientů (podráždění, infekce, alergie, toxické účinky a další).

Zástupci rodu *Cladosporium* dominují v převážné většině studií ve vnější i vnitřní vzdušné mykoflóře nezávisle na použité metodě odběru (Lázaro et al. 2000, Ollinger et al. 2020, Shelton et al. 2002, Ščevková et Kováč 2019). Ve větší či menší míře se ve vzduchu vyskytují zástupci rodů *Aspergillus*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Epicoccum*, *Penicillium*, *Phoma, Stemphylium* a dalších.

1.3. ZÁSTUPCI RODU *ALTERNARIA*

Mezi zástupce rodu *Alternaria* patří saprotrofní druhy, které se účastní rozkladných procesů, ale řada druhů je zodpovědná za onemocnění rostlin (obilniny, olejniny, ovoce, zelenina, koření) a alergie u člověka. Druhy rodu *Alternaria* se nacházejí na různých druzích rostlin, rostou však i na potravinách, textilu, půdě, hnijícím dřevu či v ptačích hnízdech. Často jsou izolovány z černých skvrn ve vlhkých vnitřních prostorech např. na okenních rámech, na vlhkém zdivu apod. Výjimečně mohou některé druhy parazitovat na člověku (dermatomykózy). Častějším zdravotním rizikem je inhalace spor, které se vyskytují v domácím prachu, a jejichž hlavním zdrojem je venkovní vegetace. Z řady mykotoxinů produkovaných zástupci rodu *Alternaria* představují nejvýznamnější riziko alternariol, alternariol monomethyl ether, kyselina tenuazonová a tentoxin. Nejvýznamnějším druhem je *Alternaria alternata*, který byl poprvé v roce 1930 spojen s alergickým astmatem (Hopkins et al. 1930).

Seznam alergenů je dostupný v četných internetových databázích (např. allergen.org, allergome.org). *Alternaria alternata* má 31 popsaných alergenů (allergome.org), z nichž prvním popsaným a zároveň nejvýznamnějším je majoritní alergen Alt a 1 (Deards et Montague 1991).

2. PRACOVNÍ POSTUPY

2.1. ODBĚR VZORKŮ VZDUCHU

Odběr vzorků z ovzduší se provádí pomocí ručních vysavačů značky Black&Decker PV1020L-QW (Obr. 1) s výměnným filtrem, jehož parametry jsou:

Výkon: 20 W
Napájecí napětí: 10,8 V
Sací výkon: 373 mm/voda
Průtok vzduchu: 1080 l/min
Objem nádoby na prach: 440 ml
Doba chodu: 10 min
První nabíjení: < 4 hod
Výstupní filtr: Ano
Cyklónové víření: Ano

Obr. 1: Přenosný akumulátorový vysavač Black&Decker PV1020L-QW, upevnění Petriho misky pro odběr mikromycetů (vpravo)

Do vnitřního prostoru vysavače je pomocí bílé lepicí hmoty upevněna Petriho miska o průměru 60 mm s bramboro-mrkvovým agarem (PCA viz Fassatiová 1979) s přidaným antibiotikem pro potlačení růstu bakterií (chloramfenikol 100 mg/l). Sejme se vrchní část misky a vysavač se zavře. Je nutné, aby byla baterie vysavače před odběrem maximálně nabita. Vysavač je umístěn na místo odběru, ideálně cca 150 cm od země do dechové zóny člověka. Zapnutím vysavače je zahájeno nasávání vzduchu, přičemž na Petriho misku uvnitř přístroje dopadají spory a úlomky houbových vláken (souhrnně nazývané CFU – colony forming units). Čas odběru venkovního vzduchu byl stanoven 1 a 3 min a ve vnitřních prostorech 8 min. Je-li k dispozici více vysavačů, provádí se zároveň více opakování, je-li k dispozici pouze 1 vysavač, provádí se opakované měření po opětovném dobití baterie. To však trvá několik hodin a taková opakování jsou především ve vnějším ovzduší vlivem měnících se klimatických faktorů hůře porovnatelná. Po vypnutí vysavače je Petriho miska odlepena, zavíčkována (víčko po dobu odběru umístit do sterilního igelitového sáčku) a inkubována 7 dní ve tmě při 20 ^{o}C. Vnitřní prostor vysavače je po použití dezinfikován ethanolem, filtr je dle potřeby možné vyměnit. Při opakovaných odběrech v jednom prostředí je prostor uvnitř vysavače a filtr pouze propláchnut ve vodě a vysušen. Zároveň je pro kontrolu vystavena alespoň jedna Petriho miska nedaleko vysavače a probíhá odběr CFU z ovzduší sedimentační metodou.

2.2. KVANTITATIVNÍ A KVALITATIVNÍ VYHODNOCENÍ

Předpoklad kultivačních metod používaných při odběru vzduchu ať už spadovou metodou či metodou aktivního nasávání vzduchu je, že počet narostlých kolonií na Petriho miskách je roven počtu houbových částic v ovzduší (CFU). Jelikož některé spory mohou být neklíčivé a na agaru tudíž nevytvoří kolonii, je tento odhad vždy nižší, než je skutečný počet spor ve vzduchu.

Po týdenní kultivaci Petriho misek (20 °C, tma) je pod binokulární lupou zjištěn počet kolonií a zároveň probíhá primární rodová identifikace mikroskopických hub na základě makroskopických a mikroskopických znaků (Ellis 1971, 1976, Hoog et Guarro 1995 a další). Sterilní kmeny jsou přeočkovány na vhodné médium (např. bramborový agar – PDA Himedia), vystaveny pod UV-C zářivku pro podporu sporulace a dále zkoumány. Izoláty, které budou podrobeny dalším pokusům a podrobnější identifikaci, lze uchovat ve zkumavkách na šikmých agarech při 4 °C (PCA).

Přepočet CFU/m^3 vzduchu je prováděn dle vzorce:

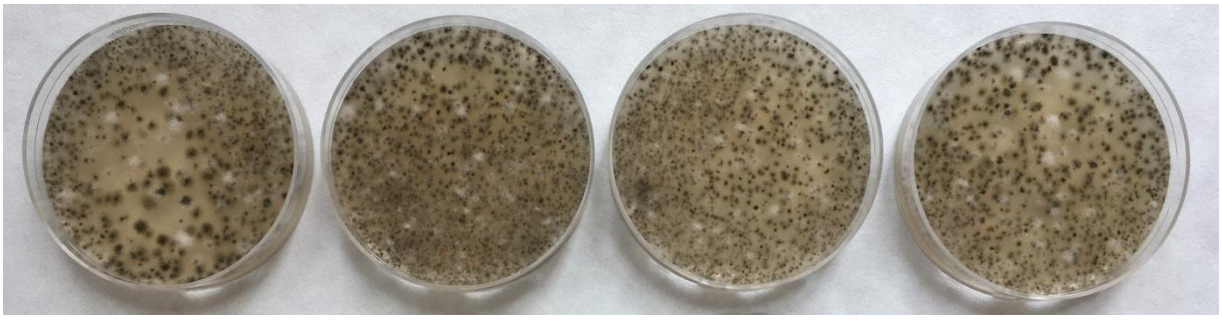
$$x = \frac{30.n}{1{,}08.t}$$

x.....počet CFU/m^3 vzduchu
n.....počet kolonií na Petriho misce po odběru a 7denní kultivaci
t.....čas odběru v min
30.....konstanta získaná poměrem objemů nádoby vysavače a Petriho misky
1,08 m^3…objem vzduchu nasátého vysavačem za 1 min

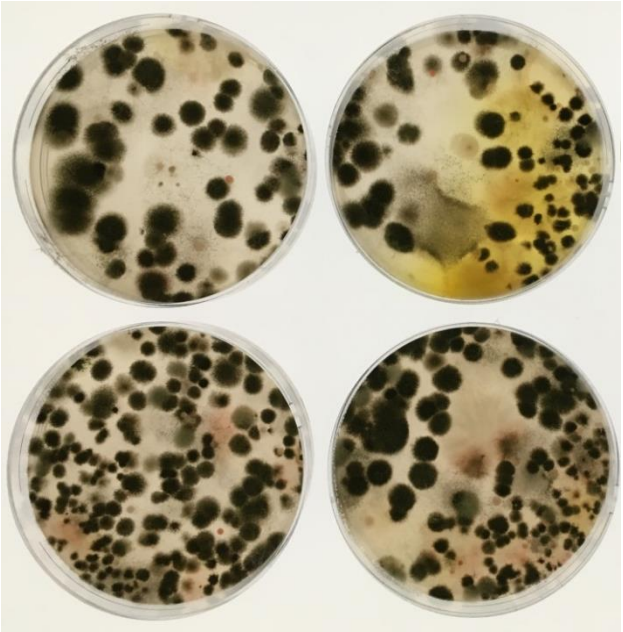
2.3. PŘÍKLAD APLIKACE METODY

2.3.1. Vnější ovzduší

Dvouletý monitoring (2019–2020) výskytu částic mikroskopických hub (CFU) ve venkovním ovzduší v Praze-Ruzyni potvrdil maximum v druhé polovině července (Obr. 2, 3) a druhý nižší vrchol koncem září. Odběry přenosnými vysavači byly prováděny v Praze-Ruzyni od začátku dubna do konce října, v chladných měsících bylo množství spor hub ve venkovním ovzduší nízké, proto nebylo toto období sledováno. Vzorky byly odebírány jednou týdně na stejném místě a ve stejném čase (12:00) po dobu 1 a 3 min.



Obr. 2: Odběr 22. 7. 2019 Praha-Ruzyně – maximum roku 2019 (čas odběru 3 min), médium PCA, kultivace 7 dní ve tmě při 20 ^{o}C

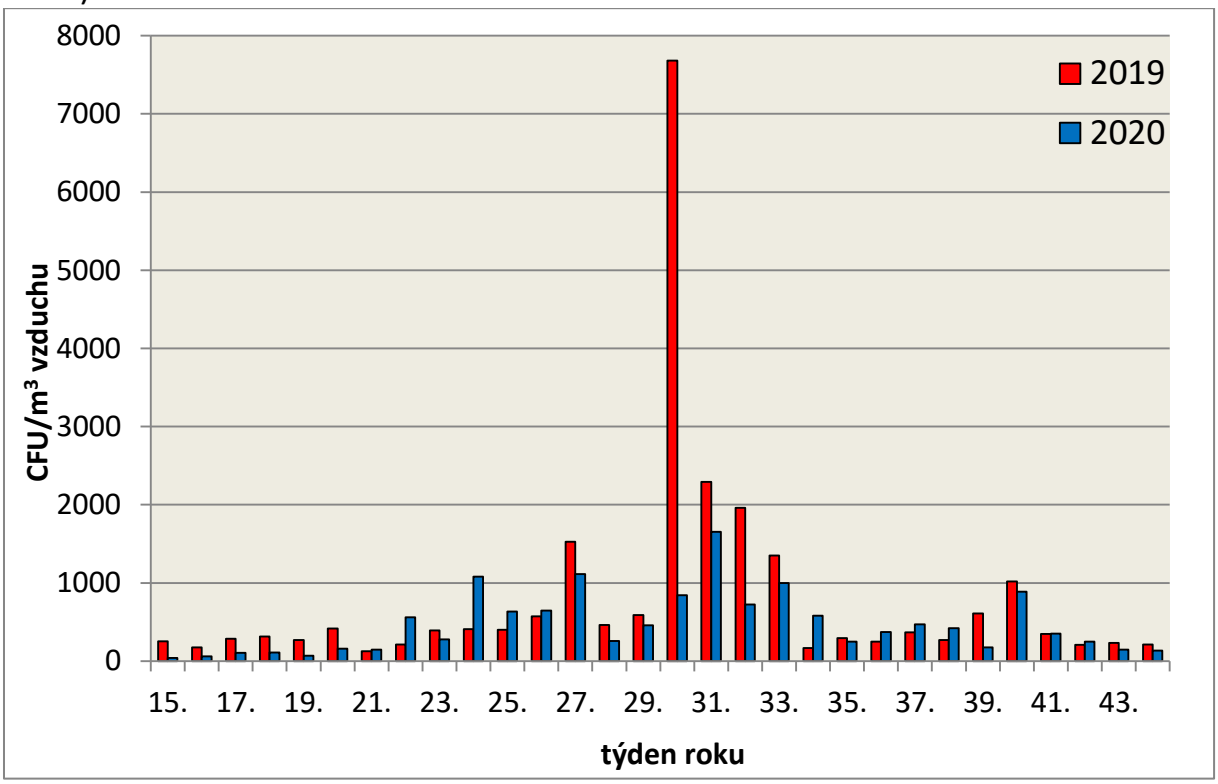


Obr. 3: Odběr 28. 7. 2020 Praha-Ruzyně – maximum roku 2020, médium PCA, kultivace 7 dní ve tmě při 20 ^{o}C (nahoře čas odběru 1 min, dole čas odběru 3 min)

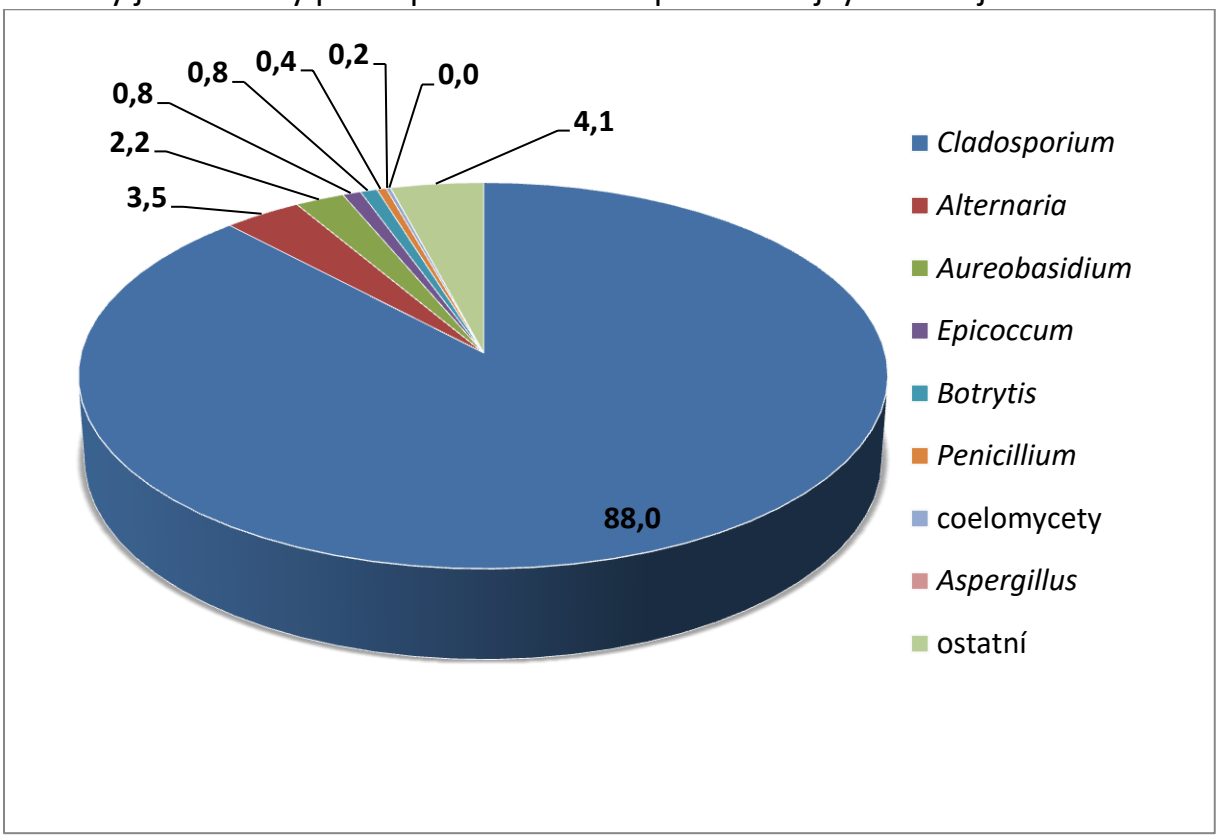
Sezónní dynamika spor hub v ovzduší zjištěná pomocí ručních vysavačů (viz Graf 1) byla obdobná jako v literatuře a množství spor většinou řádově odpovídalo výsledkům, které v pylové sezóně pravidelně zveřejňuje Státní zdravotní ústav. Jeho monitorovací přístroje odebírající pravidelně vzduch jsou však umístěny fixně ve vyšší výšce, nikoli v dechové zóně člověka.

Nejhojněji byli izolováni zástupci rodu *Cladosporium*, kteří zaujímali 88 % všech zachycených mikroskopických hub (viz Graf 2). Dále se vyskytovali zástupci rodů *Alternaria, Aureobasidium, Epicoccum, Botrytis, Penicillium*, a *Aspergillus*. Izoláty rodu *Alternaria* zaujímaly 3,5 % ze všech zjištěných mikromycet, izoláty rodu *Aspergillus* pouze 0,01 %.

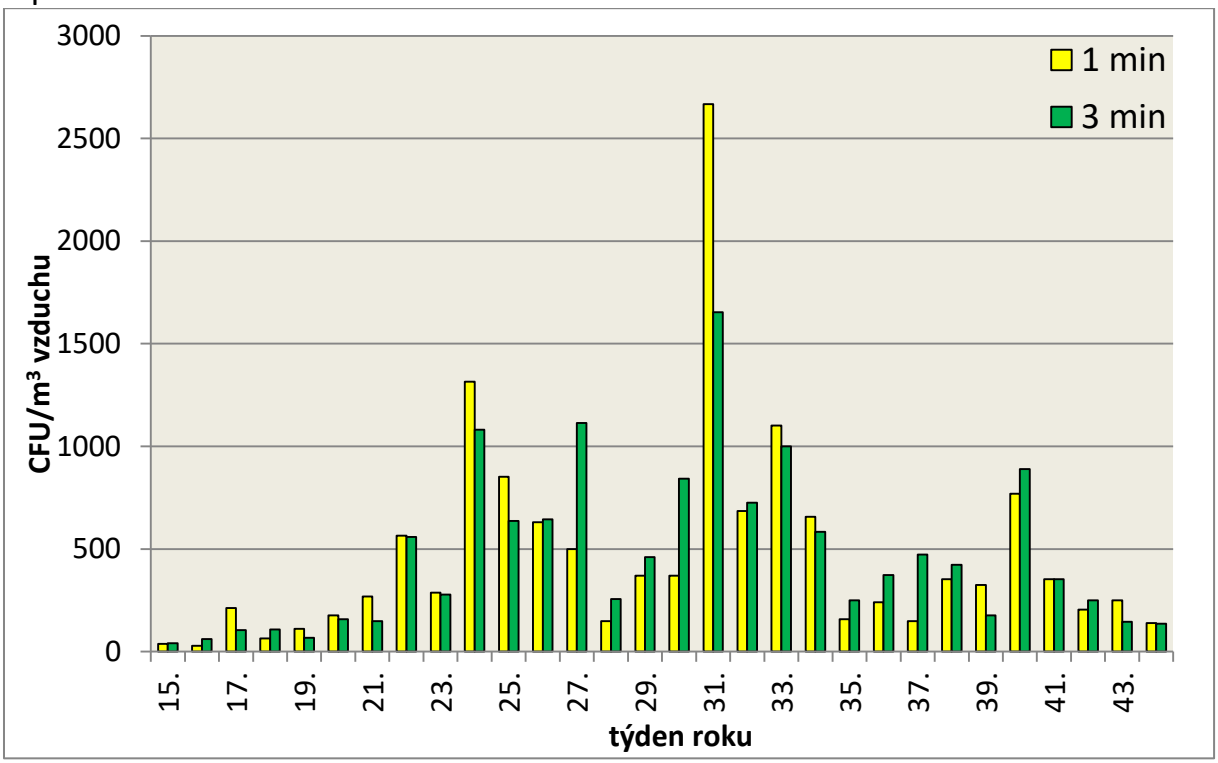
Graf 1: Dynamika zachycených CFU ve vnějším ovzduší Praha-Ruzyně (2019–2020)



Graf 2: Zastoupení rodů hub (%) ve vnějším ovzduší v Praze-Ruzyni (2019–2020) – houby jsou řazeny podle procenta zastoupení od nejvýznamnějšího



Graf 3: Dynamika zachycených CFU ve venkovním ovzduší Praha-Ruzyně (2020) – porovnání času odběru 1 min a 3 min

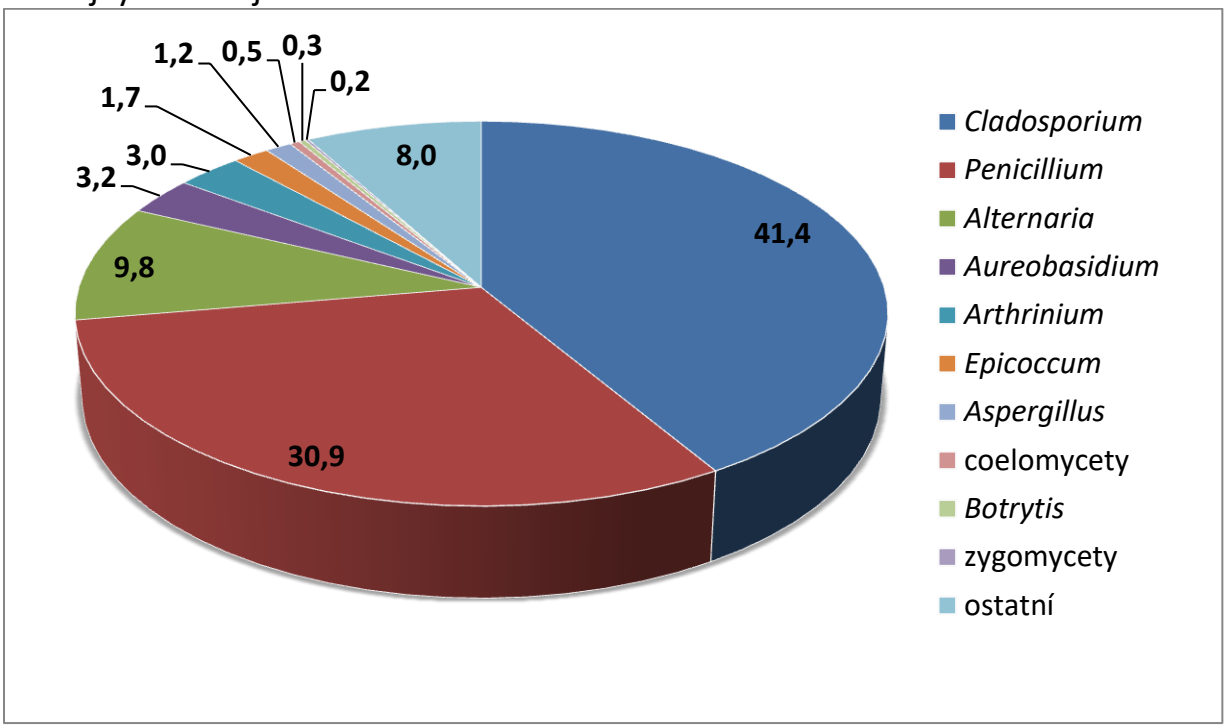


V roce 2019 byly testovány různé časy odběru vzorků, živná média i hodina odběru. Jako optimální pro venkovní ovzduší byl stanoven čas odběru 1 min a 3 min, bramboro-mrkvový agar a hodina odběru 12:00. V roce 2020 bylo všech 30 odběrů vzduchu v Praze-Ruzyni prováděno 1 a 3 min. Z Grafu 3 je patrné, že v některých odběrech s vyšší koncentrací spor hub v ovzduší je výhodnější nasávat vzduch pouze 1 min, neboť je zachyceno více CFU v přepočtu na 1 m^3 vzduchu. Po 3 min vyroste na Petriho misce příliš mnoho kolonií, které nelze spolehlivě spočítat, mnohé se překrývají a výsledná suma je tak zkreslená. Není tomu ale tak vždy, proto je vhodné použít oba odběrové časy, aby byly výsledky relevantní.

2.3.2. Vnitřní ovzduší

Pozornost byla dále věnována výskytu aeromikrobů ve vnitřních prostorách (bytech, laboratořích apod.), kde byl zjištěn nejefektivnější čas odběru 8 min. Ve vnitřním prostředí se vyskytovaly obdobné rody hub jako ve venkovním ovzduší, jen podíl zástupců jednotlivých rodů se lišil. V bytech dominovali zástupci rodů *Cladosporium* a *Penicillium*, dále pak *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Arthrinium*, *Epicoccum*, *Aspergillus* a další (Graf 4).

Graf 4: Zastoupení rodů hub (%) ve vzduchu uvnitř čtyř bytů a jednoho rodinného domu v Praze (2021) – houby jsou řazeny podle procenta zastoupení od nejvýznamnějšího



Limity Státního zdravotního ústavu v Praze pro znečištění pobytových místností a domácností mikromycety („plísněmi“) jsou znázorněny v Tab. 1.

Tab. 1: Limity koncentrací mikromycet CFU/m^3 vzduchu (Komárek 2001)

Znečištění	Pobytové místnosti	Domácnosti
velmi nízké	< 25	< 50
nízké	< 100	< 200
střední	< 500	< 1000
vysoké	< 2000	< 10000
velmi vysoké	> 2000	> 10000

2.4. MOLEKULÁRNÍ DETEKCE RODU *ALTERNARIA* A ALERGENU ALT A 1

2.4.1. Příprava vzorků DNA

Houby byly pro izolaci DNA napěstovány na Petriho miskách s živným médiem (PDA) pokrytým vrstvou sterilního celofánu. Mycelium bylo odebráno sterilním skalpelem do třecí misky s tekutým dusíkem a důkladně rozdrceno. Pro následnou izolaci DNA byl použit Qiagen DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) dle instrukcí výrobce. Kvalita a koncentrace vyizolované DNA byla ověřena

elektroforeticky na 1% agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem a pomocí spektrofotometru. Koncentrace DNA byla upravena ředěním sterilní vodou na koncentraci 100 ng/µl.

2.4.2. PCR detekce rodu *Alternaria*

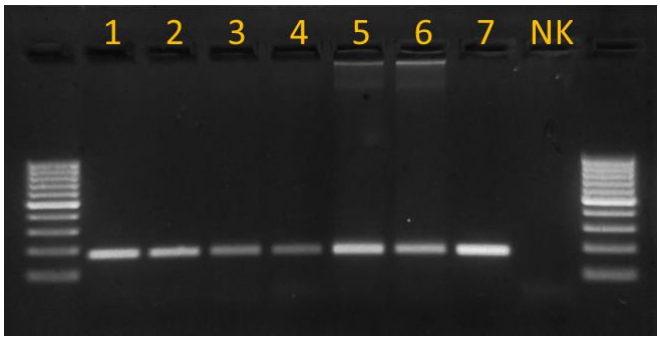
Polymerázová řetězová reakce (PCR) se specifickými primery umožňuje detekci rodu *Alternaria* a jeho rozlišení od příbuzných rodů (*Stemphylium*). Pro potvrzení zařazení získaných vzorků do toxinogenního rodu *Alternaria* byly využity specifické primery Dir5cAlta1 (5´-GAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTT-3´) a Inv4Alta1 (5´-CGCGGCAGTAGTTGGGAA-3´) (Pavón et al. 2010). Podmínky PCR reakce vycházely z postupu uvedeného v článku Pavón et al. (2010). Byla zvolena teplota annealingu (nasedání primerů) 58°C podle práce Stocco et al. (2019) a pro snížení inhibice PCR bylo do reakční směsi přidáno BSA (bovine serum albumin) (Tab. 2 a 3). Produkty PCR byly rozlišeny na 2% agarózovém gelu pomocí elektroforézy. K vizualizaci fragmentů bylo využito barvení ethidium bromidem. Primery Dir5cAlta1 a Inv4Alta1 amplifikovaly produkt o délce 195 bp (Obr. 4).

Tab. 2: Složení reakční směsi (15 µl) PCR detekce rodu *Alternaria*

Složka (zásobní koncentrace)	Objem (finální koncentrace)
H_2O	10,2 µl
CoralLoad PCR Buffer (10x)	1,5 µl (1x)
$MgCl_2$ (25 mM)	1,2 µl (2 mM)
BSA (20 mg/ml)	0,1 µl (0,1 mg/ml)
dNTPs (2,5 mM)	0,4 µl (0,07 mM)
Primery (5 µM)	0,5 µl (0,17 µM)
Taq polymerase (5 U/µl)	0,1 µl (0,03 U/µl)
DNA (100 ng/µl)	1 µl (7 ng)

Tab. 3: Reakční podmínky PCR detekce rodu *Alternaria*

Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	95°	1 min
35 cyklů	94°	30 s
	58°	30 s
	72°	45 s
1 cyklus	72°	5 min



Obr. 4: PCR detekce rodu *Alternaria* pomocí specifických primerů Dir5cAlta1 a Inv4Alta1 (1-7 pozitivní vzorky, NK – negativní kontrola, DNA žebříček: 100 bp ladder

2.4.3. PCR detekce skupiny *Alternaria alternata*

Druhy rodu *Alternaria* je možné na základě fylogenetických studií rozdělit do několika skupin. Pavón et al. (2010) popsali dvojice primerů pro detekci čtyř různých skupin druhů. Tyto primery byly popsány pro detekci rodu *Alternaria* a jednotlivých skupin druhů v potravinách k získání informací o možné přítomnosti mykotoxinů. Ve zpracovaných potravinách se totiž mohou vyskytovat nebezpečné toxiny, přestože jejich producenty není vždy možné kultivovat a určit druh. Jednotlivých druhů toxinů v potravinách je navíc velké množství a jejich stanovení je proto obtížné. Zejména druhy ze skupiny *A. alternata* mohou produkovat mykotoxiny a alergeny s různými důsledky pro potravinářství, zemědělství i zdravotnictví (alternariol, alternariol monometyl éter, kyselina tenuazonová). Do skupiny *A. alternata* patří druhy jako *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. gaisen*, *A. citri*, *A. longipes* nebo *A. arborescens*. Správné určení této skupiny je proto zásadní.

Skupina *A. alternata* byla detekována pomocí primerů AaltDAlta1 (5´-CGCATCCTGCCCTGTCA-3´) a AinfIAlta1 (5´-GTTGGTAGCCTTGATGTTGAAGC-3´) při teplotě annealingu 65 °C (Tab. 4 a 5). Primery AaltDAlta1 a AinfIAlta1 amplifikovaly produkt o délce 118 bp (Obr. 5). Do reakce může být přidán primer Dir3, který u zástupců rodu *Alternaria* v kombinaci s primerem AinfIAltra1 amplifikuje fragment o délce 97 bp.

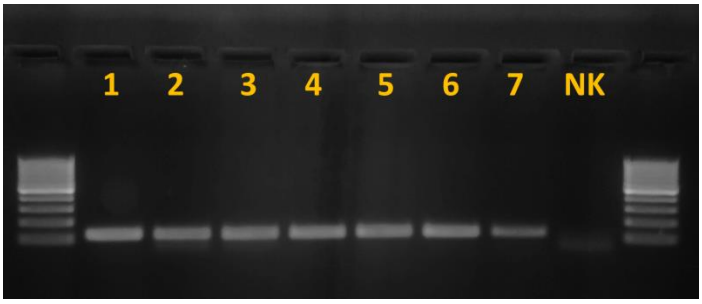
Primery AsolDAlta1 (5´-CGCATCCTGCCCCGTCT-3´) a AsolIAlta1 (5´-GTTGGTGGCCTTGATGTTGAAG-3´) detekují druhy skupiny *A. porri* při teplotě annealingu 65 °C. Skupinu *A. infectoria* určují primery AinfDAlta1 (5´-CGCATCCTGCCCAGTTG-3´) a AinfIAlta1 (5´- GTTGGTAGCCTTGATGTTGAAGC-3´), s teplotou annealingu 63 °C. Druhy patřící do skupiny *A. radicina* je možné detekovat pomocí primerů AraDAlta1 (5´-CCCGCCAGGACAACGCT-3´) a AsolIAlta1 (5´-GTTGGTGGCCTTGATGTTGAAG-3´) s teplotou annealingu 63 °C.

Tab. 4: Složení reakční směsi (15 µl) PCR detekce skupiny *Alternaria alternata*

Složka (zásobní koncentrace)	Objem (finální koncentrace)
H_2O	10,1 µl
CoralLoad PCR Buffer (10x)	1,5 µl (1x)
$MgCl_2$ (25 mM)	1,2 µl (2 mM)
BSA (20 mg/ml)	0,1 µl (0,1 mg/ml)
dNTPs (2,5 mM)	0,1 µl (0,02 mM)
Primery (5 µM)	0,9 µl (0,3 µM)
Taq polymerase (5 U/µl)	0,1 µl (0,03 U/µl)
DNA (100 ng/µl)	1 µl (7 ng)

Tab. 5: Reakční podmínky PCR detekce skupiny *Alternaria alternata*

Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	95°	1 min
35 cyklů	94°	30 s
	65°	30 s
	72°	45 s
1 cyklus	72°	5 min



Obr. 5: PCR detekce skupiny *Alternaria alternata* pomocí specifických primerů AaltDAlta1 a AinfIAlta1. 1 – 7 pozitivní vzorky, NK – negativní kontrola, DNA žebříček: 100 bp ladder

2.4.4. Detekce alergenu Alt a 1 pomocí specifických PCR primerů Alta1CF a Alta1CR s využitím cDNA

Další systém detekce alergenních hub v ovzduší je založen na genu pro alergen Alt a 1 (Gabriel et al. 2015). Protein Alt a 1 je nejvýznamnější alergen produkovaný houbami v ovzduší. Vyskytuje se specificky u druhů rodu *Alternaria* a příbuzných druhů (*Stemphylium botryosum*). Působí respirační alergie, v lékařství je používán k diagnostice citlivosti na zástupce čeledi *Pleosporaceae*. U infekcí rostlin pravděpodobně hraje Alt a 1, jako jeden z faktorů patogenity, roli související se schopností způsobovat chorobu.

Na základě vysoce konzervovaných sekvencí genu pro alergen Alt a 1 byla navržena sada primerů Alta1CF a Alta1CR (Gabriel et al. 2015) specificky amplifikující fragment o délce 180 bp u druhů *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* a *S. botryosum* (Obr. 6). Systém detekce zahrnuje reverzní transkripci a následně cDNA PCR (Tab. 6–9). Využití cDNA místo gDNA je vhodnější pro detekci živých spor producentů alergenu Alt a 1 a homologů Alt a 1 při odběrech ze vzduchu, kdy podíl živých spor není známý. Citlivost popsaných detekčních systémů pro alergen Alt a 1 je 1000 spor/1 ml vzorku.

Izolace RNA ze vzorků byla provedena komerčním kitem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Německo) s optimalizovaným protokolem. Pro úvodní krok izolace RNA byl použit TRIzol (ThermoFisher Scientific) a v průběhu izolace byly vzorky vyčištěny od zbytkové DNA na kolonce pomocí RNase-free DNase (Qiagen). S touto RNA byla provedena reverzní transkripce standardní metodou v termocykleru.

Tab. 6: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci (40 µl)

Složka (zásobní koncentrace)	**Objem**
H_2O	11,4 µl
RT buffer (10x)	4 µl (1x)
$MgCl_2$ (25 mM)	8,8 µl (5,5 mM)
dNTPs (2,5 mM)	8 µl (0,5 mM)
Oligo dT/random hexamer (50 µM)	2 µl (2,5 µM)
RNAse inhibitor (20 U/µl)	0,8 µl (0,4 U/µl)
MultiScribe reverse transcriptase (20 U/µl)	1 µl (0,5 U/µl)
RNA	4 µl

Tab. 7: Podmínky pro reverzní transkripci

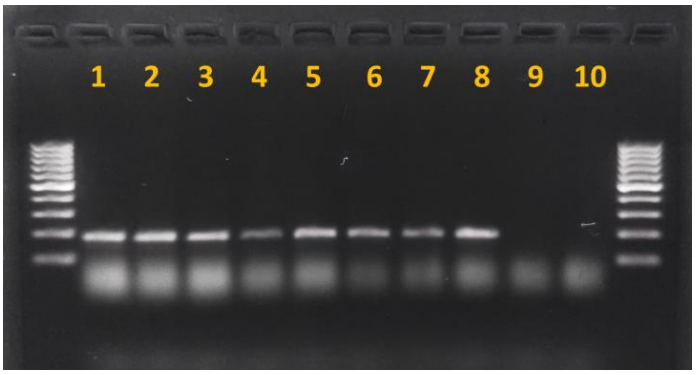
Teplota	**Čas**
65°C	5 min
4°C	2 min
37°C	30 min
95°C	5 min
4°C	5 min

Tab. 8: Složení reakční směsi (15 µl) PCR detekce genu pro alergen Alt a 1 z cDNA (15 µl)

Složka (zásobní koncentrace)	Objem (finální koncentrace)
H_2O	1,3 µl
CoralLoad PCR Buffer (10x)	1,5 µl (1x)
$MgCl_2$ (25 mM)	1,2 µl (2 mM)
dNTPs (2,5 mM)	0,4 µl (0,07 mM)
Primery (5 µM)	0,5 µl (0,17µM)
Taq polymerase (5 U/µl)	0,1 µl (0,03 U/µl)
cDNA (100 ng/µl)	10 µl (cca 70 ng)

Tab. 9: Reakční podmínky PCR detekce genu pro alergen Alt a 1 z cDNA

Počet cyklů	Proces	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	Počáteční denaturace	94°	3 min
30 cyklů	Denaturace	94°	30 s
	Nasedání primerů	55°	1 min
	Syntéza DNA	72°	1 min 10 s
1 cyklus	Závěrečná fáze	25°	5 min



Obr. 6: Detekce alergenu Alt a 1 pomocí specifických PCR primerů Alta1CF a Alta1CR s využitím cDNA. 1 – 8 *Alternaria alternata*, 9 – *Pyrenophora tritici-repentis*, 10 – *Fusarium graminearum,* DNA žebříček: 100 bp ladder

2.4.5. Detekce genu pro alergen Alt a 1 pomocí specifických PCR primerů Alta1CF a Alta1CR s využitím genomové DNA

Nově byla navržena metoda pro stanovení přítomnosti hub s genem pro alergen Alt a 1 ve sledovaném prostředí. Metoda spočívá v nasátí spor hub z ovzduší přímo na Petriho misky s médiem (PCA) pokrytým celofánem. Čas nasávání je vhodné zvolit co nejdelší (8 min), aby byla vysoká pravděpodobnost

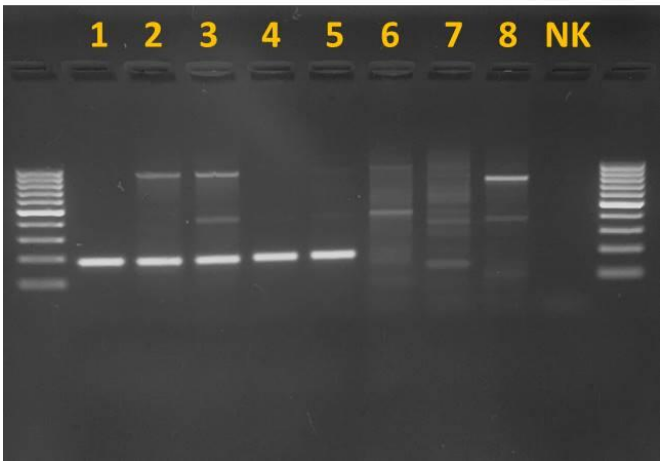
záchytu sledovaného alergenu. Po kultivaci směsi druhů hub na těchto Petriho miskách (7 dní ve tmě při 20 °C) je získané mycelium odebráno k izolaci DNA jako celek. Detekce genu pro alergen Alt a 1 se provádí pomocí specifických PCR primerů Alta1CF a Alta1CR s využitím genomové DNA (Tab. 10 a 11). Primery Alta1CF a Alta1CR amplifikují fragment o délce 180 bp (Obr. 7). Z Obr. 8 je patrné, že na Petriho miskách č. 3, 5 a 7 se vyskytl alergen Alt a 1. Zároveň byli před izolací DNA na těchto miskách mikroskopicky identifikováni zástupci rodu *Alternaria*.

Tab. 10: Složení reakční směsi (15 µl) PCR detekce genu pro alergen Alt a 1 z gDNA

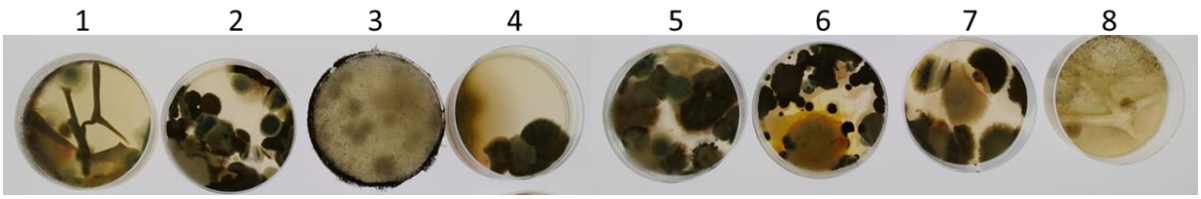
Složka (zásobní koncentrace)	Objem (finální koncentrace)
H_2O	10,3 µl
CoralLoad PCR Buffer (10x)	1,5 µl (1x)
$MgCl_2$ (25 mM)	1,2 µl (2 mM)
dNTPs (2,5 mM)	0,4 µl (0,07 mM)
Primery (5 µM)	0,5 µl (0,17 µM)
Taq polymerase (5 U/µl)	0,1 µl (0,03 U/µl)
DNA (100 ng/µl)	1 µl (7 ng)

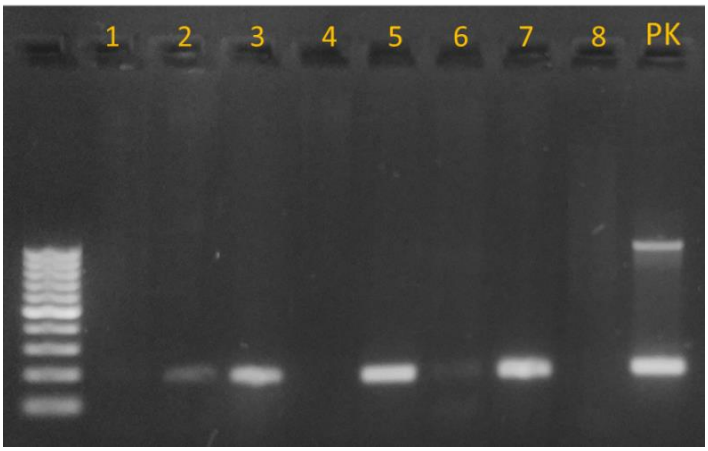
Tab. 11: Reakční podmínky PCR detekce genu pro alergen Alt a 1 z gDNA

Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	94°	3 min
30 cyklů	94°	30 s
	55°	1 min
	72°	1 min 10 s
1 cyklus	25°	5 min



Obr. 7: Detekce hub s genem pro alergen Alt a 1 pomocí specifických PCR primerů Alta1CF a Alta1CR s využitím genomové DNA. 1 – 5 *Alternaria alternata* (+), 6 – *Pyrenophora tritici-repentis* (-), 7 – *Fusarium graminearum* (-), 8 – *Fusarium verticillioides* (-), NK – negativní kontrola, žebříček: 100 bp ladder





Obr. 8: Detekce genu pro alergen Alt a 1 pomocí specifických PCR primerů Alta1CF a Alta1CR s využitím genomové DNA izolované z celých Petriho misek nasátých pomocí ručního vysavače. 1–8 sledované vzorky, PK – pozitivní kontrola, žebříček: 100 bp ladder

2.4.6. Sekvenování

Primárními charakteristikami druhů v rámci rodu *Alternaria* jsou morfologie kolonií a konidií. V některých sekcích rodu *Alternaria* však dochází k překrývání znaků morfologie konidií, což identifikaci na základě morfologie ztěžuje.

Taxonomie rodu *Alternaria* zatím není zcela jednoznačná, protože jednotlivé druhy mohou být rozlišeny pomocí malého množství morfologických znaků a v některých případech není ani molekulární fylogenetika pro vymezení druhů příliš účinná. Molekulární fylogenetika odhalila v rámci rodu *Alternaria* četné polyfyletické taxony (složené z různých vývojových linií) a výsledky molekulární fylogenetiky neodpovídají vždy morfologickým skupinám druhů.

K identifikaci jednotlivých druhů rodu *Alternaria* je proto v současnosti doporučováno využít sekvenování, sestavení dendrogramu na základě kombinace sekvencí více genů a porovnání získaných sekvencí zkoumaných položek s dostupnými sekvencemi jednotlivých druhů v databázi GenBank. Běžně se pro identifikaci druhů rodu *Alternaria* používá sekvenování oblasti GAPDH, která v kombinaci s oblastmi ITS, RPB2 a TEF1-a poskytuje uspokojivé rozlišení druhů (Woudenberg et al. 2015).

Tab. 12: Primery pro získání úseků DNA k určení druhů rodu *Alternaria* pomocí sekvenování podle Woudenberg et al. (2013)

Oblast	Primer	Sekvence	Zdroj
ITS	V9G	TTACGTCCCTGCCCTTTGTA	De Hoog & Gerrits van den Ende 1998
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. 1990
GAPDH	gpd1	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	Videira et al. 2016
	gpd2	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	Videira et al. 2016
RPB2	RPB2–5F2	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	Sung et al. 2007
	fRPB2–7cR	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	Liu et al. 1999
TEF1-α	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Videira et al. 2016
	EF2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	Videira et al. 2016

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předložená metodika popisuje nově vyvinutou metodu odběru vzorků ovzduší se zaměřením na studium mikroskopických vláknitých hub. V historii byly využívány nejrůznější metody a přístroje k odběru vzduchu. Tato metoda odběru pomocí přenosných akumulátorových vysavačů je však unikátní v tom, že je operativní a použitelná ve vnějším i vnitřním prostředí. Vysavač značky Black&Decker PV1020L-QW nasává konstantní objem vzduchu 1080 l/min, množství zjištěných houbových částic v ovzduší je tedy možné přepočíst na m^3 vzduchu. Přesnost metody byla ověřena porovnáním získaných dat s daty Státního zdravotního ústavu, který provádí obdobné měření spor hub v ovzduší Prahy a dalších 10 měst v ČR. K tomuto měření slouží pylové lapače Burkard, trvale umístěné na střechách budov, které umožňují měřit množství spor hub a pylových zrn v ovzduší.

Nově byla navržena metoda nasávání vzduchu přenosným vysavačem pro přímé stanovení přítomnosti hub s genem pro alergen Alt a 1 ve vzduchu. Není třeba původní odebrané Petriho misky s koloniemi hub mikroskopovat a přeočkovávat potenciální nositele genu, ale tyto misky jsou přímo použity pro molekulární analýzy. Metoda je přesnější a umožňuje odhalit i malé množství houbového mycelia.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena především pro firmy a hygienické stanice zabývající se čistotou vnitřního a vnějšího ovzduší, ale také pro mykologické či mikrobiologické laboratoře. Při podezření na kontaminaci pracovního nebo domácího prostředí lze pomocí metodiky určit přibližný počet houbových částic ve vzduchu a poté případně vyhledat pomoc odborníka pro odstranění příčiny. Poměrně často se setkáváme s nadlimitním počtem spor hub v prašném prostředí zemědělských provozů, ale i v pekárnách, jídelnách a restauračních zařízeních, kde je vysoká vlhkost v podobě páry. Ve starých cihlových domech jsou rizikové zdi s vysokými rozdíly teplot mezi vnitřní a vnější stranou.

Metodika je též využitelná v lékařství, neboť výskyt houbových částic v ovzduší jde ruku v ruce s alergickou reakcí u citlivých jedinců. Pravidelným monitoringem spor hub ve venkovním prostředí i ve vzduchu obytných místností je možné předejít nepříjemným reakcím v podobě astmatických záchvatů či kožních reakcí. U některých houbových alergenů jsou již známy prahové hodnoty, které mohou vyvolat nežádoucí reakce u citlivých jedinců. U zástupců rodu *Alternaria* je to 80 spor/m^3 vzduchu, u rodu *Cladosporium* 2800 spor/m^3 (Rapiejko et al. 2004).

Metodika může sloužit jako pilotní studie pro další rozvoj metod odběru vzdušných mikromycetů pomocí ručních vysavačů.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Monitoring mikroskopických hub jako původců alergií je důležitý především z hlediska zdraví člověka. Od doby, co jsou známé některé z alergenů, je snadnější diagnostika a včasná léčba chorob, které způsobují (Zdvihalová 2010). Proto je výzkum a hledání těchto hub v ovzduší tak důležitý ve všech částech světa (Henríquez et al. 2001). Významný vliv na lidské zdraví má především vnitřní prostředí, neboť člověk tráví v interiérech budov podstatnou část svého života. Monitoring mikroskopických hub podle předložené metodiky může zamezit nadlimitním výskytům alergenů nejen bytech, ale také v pracovním prostředí. Rizikové jsou především kanceláře bez pravidelného přístupu čerstvého vzduchu vlivem klimatizace, provozovny se zvýšenou vlhkostí vzduchu (jídelny, kuchyně, pekárny), zemědělské závody a další.

Vše, co je spojené se zdravotním stavem lidstva, má kromě přímého dopadu na člověka také ekonomický aspekt.

VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Beffa, T., Fischer, J. L., Aragno, M. (1995). Industrial sources and dispersion in the air of fungal spores. Mycologia Helvetica 7(2): 125–130.

Booth, C. et al. (1971). Methods in microbiology. Vol. 4. – 795 p., London et New York.

Burge, H. A., Solomon, W. R. (1987). Sampling and analysis of biological aerosols. Atmosph. Environ. 21: 451–456.

DeCosemo, G. A., Stewart, I. W., Griffiths, W. D., Deans, J. S. (1992). The assessment of airborne microorganisms. J. Aerosol. Sci. 23(1): 683–686.

Deards, M.J., Montague, A.E. (1991). Purification and characterisation of a major allergen of Alternaria alternata. Mol. Immunol. 28: 409–415.

Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. 608 p., Kew.

Ellis, M. B. (1976). More Dematiaceous Hyphomycetes. 507 p., Kew.

Fassatiová, O. (1979). Plísně a vláknité houby v technické mikrobiologii. 240 p., Praha.

Fišar, Z., Hýsek, J., Binek, B. (1990). Quantification of airborne microorganisms and investigation of their interactions with non-living particles. Int. J. Biometeorol. 34: 189–193.

Flannigan, B. (1992). Indoor microbiological pollutants - sources, species, characterisation and evaluation. In: Knöppel H. et Wolkoff P. [Eds.], Chemical, microbiological, health and comfort aspects of indoor air quality, p. 73–98, Brussels et Luxembourg.

Gabriel, M. F., Postigo, I., Gutiérrez-Rodríguez, A., Suñén, E., Tomaz, C. T., Martínez, J. (2015). Development of a PCR-based tool for detecting immunologically relevant Alt a 1 and Alt a 1 homologue coding sequences. Medical Mycology 53: 636–642.

Henríquez, V. I., Villegas, G. R., Nolla, J. M. R. (2001). Airborne fungi monitoring in Santiago, Chile. Aerobiologia 17(2): 137–142.

de Hoog, G. S., Gerrits van den Ende, A. H. G. (1998). Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. Mycoses 41: 183–189.

de Hoog, G. S., Guarro, J. [Eds.] (1995). Atlas of clinical fungi. 720 p., Baarn et Reus.

Hopkins, J.G., Benham, R.W., Kesten, B.M. (1930). Asthma due to a fungus Alternaria. JAMA 94: 6–10.

Juozaitis, A., Willeke, K., Grinshpun, S. A., Donnely, J. (1994). Impaction onto a glass slide or agar versus impingement into a liquid for the collection and recovery of airborne microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 60(3): 861–870.

Klánová, K. (2002). Effect of zeolites on bacteria, moulds and dust mite allergens in household dust and indoor air. Chimica Oggi-Chemistry Today 20(5): 56–59.

Komárek, L. (2001). Standardní operační postupy pro vyšetřování mikroorganismů v ovzduší a pro hodnocení mikrobiologického znečištění ovzduší ve vnitřním prostředí. Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica 1, 20 p.

Lázaro, J.A.A.,Ferrer, T. D.-T., Cabo, G.J.F., Gargallo, C.L., Asensio, C.B., Moure, A.A.R. (2000). An aerobiological study in the rural areas of Aragon (Spain) with a high population of pigs. Grana 39: 259–265.

Liu, Y. J., Whelen, S., Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerse II subunit. Molecular Biology and Evolution 16: 1799–1808.

Miller, J. D., Laflamme, A. M., Sobol, Y., Lafontaine, P., Greenhalgh, R. (1988). Fungi and fungal products in some canadian houses. Int. Biodet. 24: 103–120.

Mouilleseaux, A. (1990). Sampling methods for bioaerosols. Aerobiologia Fidenza, 6: 32–35.

Ollinger, N., Lasinger, V., Probst, C., Pitsch, J., Lulyok, M. (2020). DNA barcoding for the identification of mold species in bakery plants and products. Food Chemistry 318: 126501.

Pavón, A. M., González, I., Pegels, N., Martín, R., García, T. (2010). PCR detection and identification of Alternaria species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. Food Control 21: 1745–1756.

Rapiejko, P., Lipiec, A., Wojdas, A., Jurkiewicz, D. (2004). Threshold pollen count necessary to evoke allergic symptoms. Int. Rev. Allergol. Clin. 10: 91–94.

Shelton, B.G., Kirkland, K.H., Flanders, W.D., Morris, G.K. (2002). Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. App. Environ. Microbiol. 68(4): 1743–1753.

Stewart, S. L., Grinshpun, S. A., Willeke, K., Terzieva, S., Ulevicius, V., Donnely, J. (1995). Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 61(4): 1232–1239.

Stocco, A. F., Diaz, M. E., Rodríguez Romera, M. C., Mercado, L. A., Rivero, M. L., Ponsone, M. L. (2019). Biocontrol of postharvest Alternaria decay in table grapes from Mendoza province. Biological Control 134: 114–122.

Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L., Spatafora, J. W. (2007). A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. Molecular Phylogenetics and Evolution 44: 1204–1223.

Ščevková, J., Kováč, J. (2019). First fungal spore calendar for the atmosphere of Bratislava, Slovakia. Aerobiologia 35: 343–356.

Šimordová, M. (1978). Mikroflóra ovzduší u různých zemědělských technologií a metody jejího sledování. 63 p., ms. [Postgr. pr., depon. in: Knih. kat. botaniky PřF UK Praha].

Videira, S. I. R., Groenewald, J. Z., Braun, U., Shin, H. D., Crous, P. W. (2016). All that glitters is not Ramularia. Studies in Mycology 83: 49–163.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.. In PCR Protocols: a guide to methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, San Diego, California, USA: 315–322.

Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., Crous, P. W. (2013). Alternaria redefined. Studies in Mycology 75: 171–212.

Woudenberg, J.H.C., Seidl, M. F., Groenewald, J. Z., de Vries, M., Stielow, J. B., Thomma, B. P. H. J., Crous, P. W. (2015). Alternaria section Alternaria: Species, formae speciales or pathotypes? Studies in Mycology 82: 1–21.

Zdvihalová, B. (2010). Aeromykologie – výskyt spór hub v ovzduší. 61 p., ms. [https://theses.cz/id/4pwo0m/Barbora_Zdvihalova_Bakalarska_prace.pdf].

VI. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Hanzalová, A., Dumalasová, V., Zelba, O. (2021). Virulence in the Puccinia triticina population in the Czech Republic and resistance genes in registered cultivars 1966–2019. Euphytica 217 (4): https://doi.org/10.1007/s10681-020-02733-4.

King, K.M., Eyres, G.J., West, J.S., Siraf, C., Matušinsky, P., Palicová, J., Canning, G.G.M., Bateman, G.L., Fraaije, B.A., Dyer, P.S. (2021). Novel Multiplex and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays for Rapid Species and Mating-Type Identification of Oculimacula acuformis and O. yallundae (Causal Agents of Cereal Eyespot), and Application for Detection of Ascospore Dispersal and in planta Use. Phytopathology 111: 582–592.

Palicová, J., Matušinsky, P., Hanzalová, A., Svačinová, I., Dumalasová, V., Chrpová, J. (2020). Reaction of winter wheat cultivars to eyespot assessed visually and by real-time PCR. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 56(1): 9–14.

Patáková (Palicová), J. (1997). Studium mikromycetů v aspirabilní frakci prašného aerosolu v ovzduší Prahy. 109 p., ms. [Dipl. pr., depon. in: Knih. kat. botaniky PřF UK Praha].

Autoři:
Mgr. Jana Palicová, Ph.D. VÚRV, v.v.i.
RNDr. Veronika Dumalasová, Ph.D. VÚRV, v.v.i.
Ing. Ondřej Zelba VÚRV, v.v.i.
Mgr. Alena Hanzalová, Ph.D. VÚRV, v.v.i.
Ing. Martina Trávníčková VÚRV, v.v.i.
Ing. Jana Chrpová, CSc. VÚRV, v.v.i.

Název: METODIKA DETEKCE HOUBOVÝCH ALERGENŮ Z OVZDUŠÍ SE ZAMĚŘENÍM NA ROD *ALTERNARIA*

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, Praha 6 – Ruzyně 161 06

Náklad: 70 výtisků

Vyšlo: 2021, první vydání

Foto: Veronika Dumalasová, Jana Palicová, Ondřej Zelba

Metodika je poskytována bezplatně a je veřejně přístupná na www.vurv.cz

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu: palicova@vurv.cz

Poděkování:
Děkujeme Šárce Bártové, Lence Urbánkové, Ingrid Rutrlové, Marii Vlčkové a Ing. Zdeňku Patákovi za technickou podporu při odběrech vzorků i při zpracování metodiky.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2021

ISBN 978-80-7427-359-9

VÚRV

Výzkumný ústav
rostlinné výroby

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2021