



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

KVASINKY POLYFYLETICKÉHO RODU CRYPTOCOCCUS - ICH VLASTNOSTI A VÝSKYT V PŘÍRODE

YEASTS OF POLYPHYLETIC GENUS CRYPTOCOCCUS - CHARACTERISTICS AND OCCURENCE IN THE NATURE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Natália Švecová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Hana Schusterová, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1413/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Natália Švecová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Hana Schusterová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Kvasinky polyfyletického rodu *Cryptococcus* – ich vlastnosti a výskyt v přírode

Zadání diplomové práce:

Kvasinky rodu *Cryptococcus* tvoria heterogénnu skupinu zväčša kapsulárnych druhov, ktoré sú v prírode pomerne rozšírené. Mnohé z nich spôsobujú ochorenia pacientov so zníženou imunitou, a preto je dôležité sledovať tieto druhy a ich vlastnosti. Táto práca sa venuje identifikácii druhov vyskytujúcich sa na lúkach a v záhradách.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Natália Švecová
student(ka)

Ing. Hana Schusterová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Kvasinky rodu *Cryptococcus* patria medzi bazídiomycéty, ktoré v prírode tvoria širokú skupinu s rôznym geografickým rozšírením. Mnohé z nich sa radia medzi ľudské patogény, ktoré ohrozujú hlavne pacientov so zníženou imunitou. Vďaka veľkej rozmanitosti na úrovni poddruhov, vykazujú jednotlivé druhy rodu *Cryptococcus* odlišné molekulárne charakteristiky. Ich identifikácia je zložitá, hlavne vďaka prítomnosti polysacharidovej kapsuly, ktorá obklopuje bunku niektorých druhov. Táto práca sa venuje identifikácii druhov vyskytujúcich sa na lúkach a v záhradách. 79 vzoriek kvasiniek je podrobených identifikácii prostredníctvom metódy MALDI-TOF MS. Súčasne s identifikáciou sa u vzoriek sleduje vplyv rôznych kultivačných médií na výsledky identifikácie. Keďže u mnohých druhov je prítomná kapsula, ďalším sledovaným parametrom je vplyv metódy prípravy vzorky a použitej matrice na identifikáciu. V experimentálnej časti je na úrovni druhu identifikovaných 51 vzoriek kvasiniek rodu *Cryptococcus*. Vybrané vzorky sú ďalej podrobené stanoveniu charakteristík prostredníctvom konvenčných mikrobiologických metód. Sledovanými parametrami sú prítomnosť ureázy, konštanta radiálneho rastu, citlivosť na antimykotiká, fermentácia a asimilácia cukrov, rast v prítomnosti alkoholov a rast bez prítomnosti vitamínov. Na základe mikrobiologických výsledkov sú vzorky približne zaradené do jednotlivých druhov kvasiniek. Biotypizácia priniesla zaradenie vybraných vzoriek do druhov *Filobasidium magnum*, *Filobasidium oeirense* a *Filobasidium wieringae*. Ďalšie vzorky vykazovali nejednoznačnú identifikáciu. Tieto druhy však majú rovnaké vlastnosti, takže ich nebolo možné rozlíšiť zvolenými mikrobiologickými testami.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Biotypizácia, MALDI-TOF MS, Rod *Cryptococcus*

ABSTRACT

Yeasts of genus *Cryptococcus* belong to the Basidiomycetes, a wide group with different geographical sharing in nature. Many of them rank among human pathogens that endanger immunocompromised patients. Thanks to the big diversity at the level of subspecies, various species of the genus *Cryptococcus* show different molecular characteristics. Their identification is difficult because of the presence of polysaccharide capsule that surrounds the cell of some species. This work deals with the identification of species occurring in meadows and gardens. The 79 yeasts samples are identified by MALDI-TOF MS. The influence of different culture media on the identification results is monitored simultaneously with the identification. Since a capsule is present in many species, another parameter to be monitored is the influence of the sample preparation method and the matrix on the identification. 51 samples of yeasts of the genus *Cryptococcus* are identified at the species level in the experimental part. Selected samples are further subjected to the determination of characteristics by conventional microbiological methods. The determined parameters are the presence of urease, radial growth constant, susceptibility to antimycotics, fermentation and assimilation of sugars, growth in the presence of alcohols and growth in the absence of vitamins. The yeast samples are classified into yeast species based on microbiological results. Biotyping resulted in identification of selected samples in the species *Filobasidium magnum*, *Filobasidium oeirense* and *Filobasidium wieringae*. Other samples showed ambiguous identification. As these species have the same properties, they could not be distinguished by the selected microbiological tests.

KEYWORDS

Biotyping, MALDI-TOF MS, the genus of *Cryptococcus*

ŠVECOVÁ, Natália. *Kvasinky polyfyletického rodu Cryptococcus - ich vlastnosti a výskyt v prírode*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123917>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Hana Schusterová, PhD.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis

POĎAKOVANIE

Touto cestou ďakujem svojej školiteľke Ing. Hane Schusterovej, PhD. za jej pomoc, odborné vedenie a množstvo cenných rád a pripomienok, ktoré mi pomohli pri riešení tejto diplomovej práce. Taktiež ďakujem Mgr. Ágnes Horváthovej a Mgr. Barbore Stratilovej za ich pomoc, ochotu a odborné rady. Ďakujem aj svojej rodine a priateľom za ich trpezlivosť a podporu počas celého môjho štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Kvasinky rodu <i>Cryptococcus</i>	9
2.1.1	Charakteristika	9
2.1.2	Výskyt a biotechnologické využitie.....	10
2.1.3	Diagnostika	13
2.1.4	Liečba.....	14
2.2	Metódy identifikácie kvasiniek	14
2.2.1	Mikrobiologické metódy	14
2.2.2	Molekulárne metódy	19
2.2.3	Hmotnostná spektrometria	20
3	CIELE PRÁCE.....	26
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
4.1	Zoznam použitých druhov kvasiniek ako štandardov pre biotypizáciu	27
4.2	Zoznam použitých kvasiniek rodu <i>Cryptococcus</i> na identifikáciu.....	27
4.3	Zoznam použitých prístrojov a chemikálií	29
4.3.1	Použité prístroje	29
4.3.2	Použité chemikálie	29
4.3.3	Použité softwarové programy	31
4.4	Biotypizácia MALDI-TOF MS	31
4.4.1	Príprava kultivačných médií	31
4.4.2	Inokulácia a kultivácia kvasiniek.....	31
4.4.3	Príprava použitých matric	32
4.4.4	Odber vzorky.....	32
4.4.5	Metódy prípravy vzorky.....	32
4.4.6	Nanášanie vzorky na MALDI platničku	33
4.4.7	Analýza vyextrahovaných proteínov MALDI-TOF MS.....	33
4.4.8	Spracovanie a vyhodnotenie dát	33
4.5	Mikrobiologické metódy stanovenia jednotlivých charakteristík	34
4.5.1	Zoznam testovaných kultúr kvasiniek.....	34
4.5.2	Stanovenie konštanty radiálneho rastu.....	35
4.5.3	Stanovenie prítomnosti ureázy.....	35
4.5.4	Stanovenie asimilácie a fermentácie cukrov	36

4.5.5 Stanovenie citlivosti na antimykotiká.....	37
4.5.6 Rast bez prítomnosti vitamínov	38
4.5.7 Sledovanie rastu v prítomnosti alkoholov.....	38
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA	40
5.1 Biotypizácia MALDI-TOF MS	40
5.1.1 Vplyv kultivačného média	42
5.1.2 Vplyv metódy prípravy vzorky	44
5.1.3 Taxonomické zaradenie	46
5.2 Mikrobiologické stanovenie jednotlivých charakteristík kvasiniek	47
5.2.1 Stanovenie konštanty radiálneho rastu.....	47
5.2.2 Stanovenie prítomnosti ureázy.....	49
5.2.3 Stanovenie asimilácie a fermentácie cukrov	50
5.2.4 Stanovenie citlivosti na antimykotiká	51
5.2.5 Rast bez prítomnosti vitamínov	53
5.2.6 Sledovanie rastu v prítomnosti alkoholov.....	53
6 ZÁVER.....	55
7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	58
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	72

1 ÚVOD

V roku 1854 izolovali dvaja nemeckí lekári Otto Busse a Abraham Buschke kvasinky podobné *Saccharomyces* z granulómu holennej kosti svojej pacientky [1; 2]. Neskôr v tom istom roku izoloval tieto kvasinky, z fermentujúcej broskyňovej šťavy a tura domáceho, taliansky lekár a vedec Francesco Sanfelice, ktorý ich nazval *Saccharomyces neoformans* a *Saccharomyces lithogenes* [3]. Definitívne boli pomenované v roku 1901 francúzskym patológom Jean Paul Vuilleminom. Busseho a Buschkeho kvasinky klasifikoval ako *Cryptococcus hominus* a Sanfeliceho *Cryptococcus neoformans* a *Cryptococcus lithogenes* [4]. Od začiatku 20. storočia sa počet klinických objavov kvasiniek rodu *Cryptococcus* neustále zvyšoval. Názov *Cryptococcus* pochádza z gréckeho slova kryptos, ktoré v preklade znamená „skryté“, čo naznačuje neprítomnosť endospór u tohto rodu kvasiniek. Tieto kvasinky majú široký geografický výskyt, čo umožnilo vývin druhov s rozdielnymi genetickými charakteristikami. Nepatogénne druhy sa často vyskytujú na lúkach a záhradách. Patogénne druhy kvasiniek, medzi ktoré patria *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gatti* a iné, boli nájdené vo vtáčom truse, či na eukalyptových listoch. Väčšina kvasiniek rodu *Cryptococcus* sa vyznačuje tvorbou polysacharidovej kapsuly, ktorá bunku chráni a zároveň je dôležitým virulentným faktorom pri prepuknutí infekcie.

Patogénne druhy rodu *Cryptococcus* sú pôvodcami ochorenia kryptokokózy, ktoré najčastejšie napáda pľúca a centrálny nervový systém. Diagnostika je sprevádzaná mikrobiologickým vyšetrením a často je kombinovaná s inými druhmi stanovenia.

Klasické mikrobiologické metódy identifikácie kvasiniek zahŕňajú stanovenie fyziologických a morfológických vlastností. Tieto metódy identifikácie sú však často nedostatočné, hlavne kvôli podobnosti jednotlivých druhov. Preto sú dnes na identifikáciu kvasiniek využívané hlavne metódy molekulárnej biológie, ktorej základy položili Američania Cletus P. Kurtzman a Jack W. Fell. V roku 1998 sa stali editormi 4. edície knihy *The Yeasts: A Taxonomic Study*, ktorá zahŕňa kompletnú klasifikáciu kvasiniek. Z metód molekulárnej biológie dnes prevláda metóda využívajúca polymerázovú reťazovú reakciu, avšak toto stanovenie je finančne náročné. V posledných rokoch sa ako ďalšie druhy stanovenia kvasiniek rozvinuli metódy hmotnostnej spektrometrie. Z týchto metód sa rozšírila hlavne metóda MALDI-TOF MS, ktorá je rýchla, lacná a má dobré detekčné limity. Preto je často využívaná aj pri komplikovanejších stanoveniach.

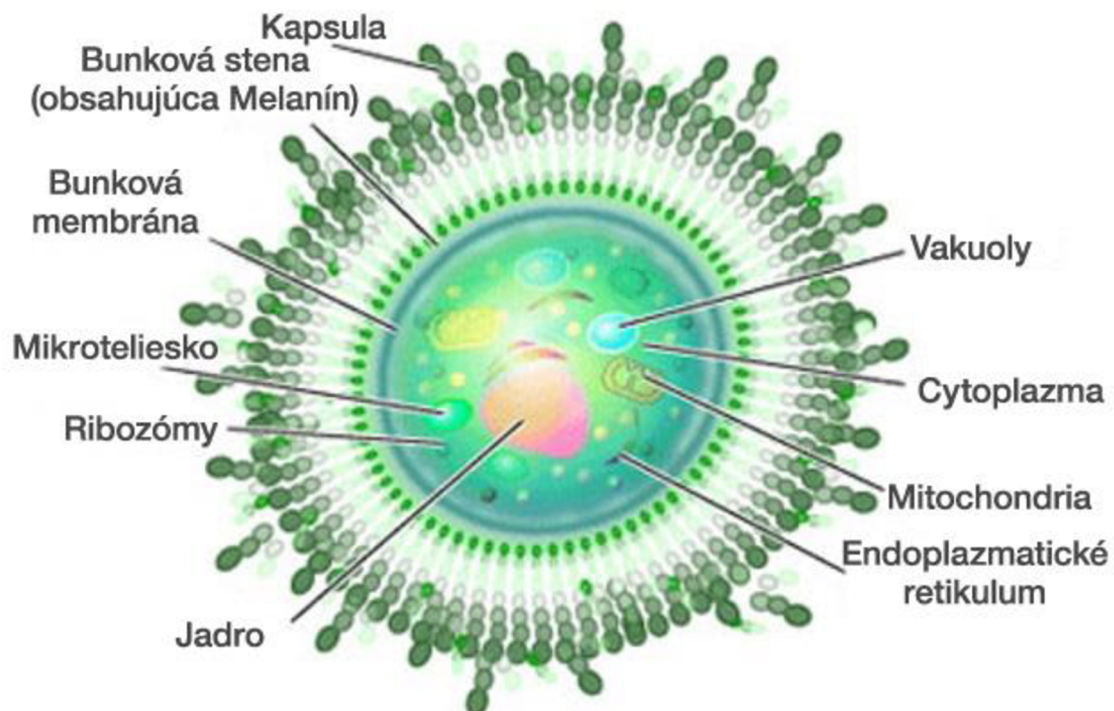
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Kvasinky rodu *Cryptococcus*

Rod *Cryptococcus* sa vyznačuje veľkou rozmanitosťou na úrovni poddruhov, z ktorých každý je geneticky rozdielny a vytvára odlišné molekulárne typy. Medzi hlavné dôvody týchto odlišností patria rôzna geografická distribúcia druhov a odlišné molekulárne charakteristiky.

2.1.1 Charakteristika

Dnes je známe, že kvasinky polyfyletického rodu *Cryptococcus* sú eukaryotické organizmy, ktoré patria do ríše *Fungi*, oddelenia *Basidiomycota*, triedy *Tremellomycetes* a radu *Tremellales* [5]. Veľkosť ich buniek, štruktúra a vlastnosti varujú v závislosti od hostiteľa. Kolónie na pevnom médiu môžu mať bielu, béžovú alebo žltohnedú farbu. Niektoré druhy produkujú červené, oranžové, žlté alebo tmavohnedé pigmenty, textúra kolónií je od maslovej po hlienovitú [5]. Vo všeobecnosti sa tento rod kvasiniek vyznačuje okrúhlymi bunkami s veľkosťou 5–7 μm , ktorých bunková stena pozostáva z chitínu (ktorý je základnou stavebnou zložkou bunkovej steny), betaglukánov (ktoré poskytujú štrukturálnu integritu), pórov (umožňujúcich pohyb dôležitých molekúl a transportných vezikúl), melanínu (ktorý chráni bunku pred oxidačným stresom) a proteínov, ktoré majú rôzne bunkové funkcie (Obrázok 1) [6; 7; 8].



Obrázok 1: Bunka *Cryptococcus neoformans* [9].

Pre tento rod kvasiniek je charakteristická tvorba širokej mukopolysacharidovej kapsuly – hlavne u druhov *Cryptococcus neoformans* a *Cryptococcus gattii* [10]. Polysacharidové kapsule sa vyskytujú bežne u baktérií, pre kvasinky však nie sú typické. Výnimku tvorí rod *Cryptococcus* a *Rhodotorula* [11]. Štruktúra polysacharidovej kapsuly je popísaná najpodrobnejšie pre rod *Cryptococcus neoformans*. Skladá sa hlavne z glukuronoxylomanánu (GXM), ktorý pozostáva z kyseliny glukurónovej, xylózy, manózy a môže taktiež obsahovať O-acetylové skupiny. Ďalšími zložkami kapsuly sú galaktoxylomanán (GalXM) a manoproteíny [12; 13]. Kapsula je veľmi dôležitá pre bunku, pretože ju chráni pred fagocytózou a je hlavným virulentným faktorom pri chorobe a infekcii.

Medzi ďalšie charakteristiky kvasiniek rodu *Cryptococcus* patrí tvorba tzv. titánových buniek. Sú to bunky, ktoré majú priemer väčší ako 12 μm (bez kapsule) [14]. Vďaka vysoko zosieťovanej kapsule a zosilnenej bunkovej stene takéto bunky odolávajú fagocytóze a zároveň pred ňou ochraňujú aj menšie bunky v ich okolí [15].

Rod *Cryptococcus* sa rozmnožuje zväčša nepohlavne multilaterálnym, prípadne polárnym enteroblastickým pučaním a môže tvoriť pravé hýfy alebo pseudohýfy. Pri druhoch tvoriacich pravé hýfy majú septá dolipóry s parentozómami alebo bez nich. Artrokonídie ani balistokonídie nie sú tvorené. Tento typ rozmnožovania sa vyskytuje hlavne u druhov, ktoré majú ľudského hostiteľa [5]. Pri pohlavnom rozmnožovaní dochádza k fúzii dvoch haploidných buniek, čím vznikne dvojjadrová hýfa. Na konci hýfy sa tvorí bazídium, ktoré produkuje bazidiospóry [16]. Tento typ rozmnožovania zvyšuje genetickú diverzitu a tým aj potenciálnu virulenciu [17].

Všetky známe druhy využívajú D-glukuronát a väčšina kmeňov syntetizuje extracelulárne polysacharidy podobné škrobu. Kmene, ktoré neprodukujú škrob, využívajú myo-inozitol a D- glukuronát, čím sa odlišujú od druhov rodu *Rhodotorula*. Schopnosť fermentovať cukry u rodu *Cryptococcus* nie je prítomná. Testy na ureázu a diazóniovú modrú B (DBB), ktorými je možné rozlíšiť askomycéty od basiomycét, sú pozitívne v prípade bazidiomycét. V roku 2011 bolo známych 70 druhov rodu *Cryptococcus* s rôznym geografickým výskytom [5].

2.1.2 Výskyt a biotechnologické využitie

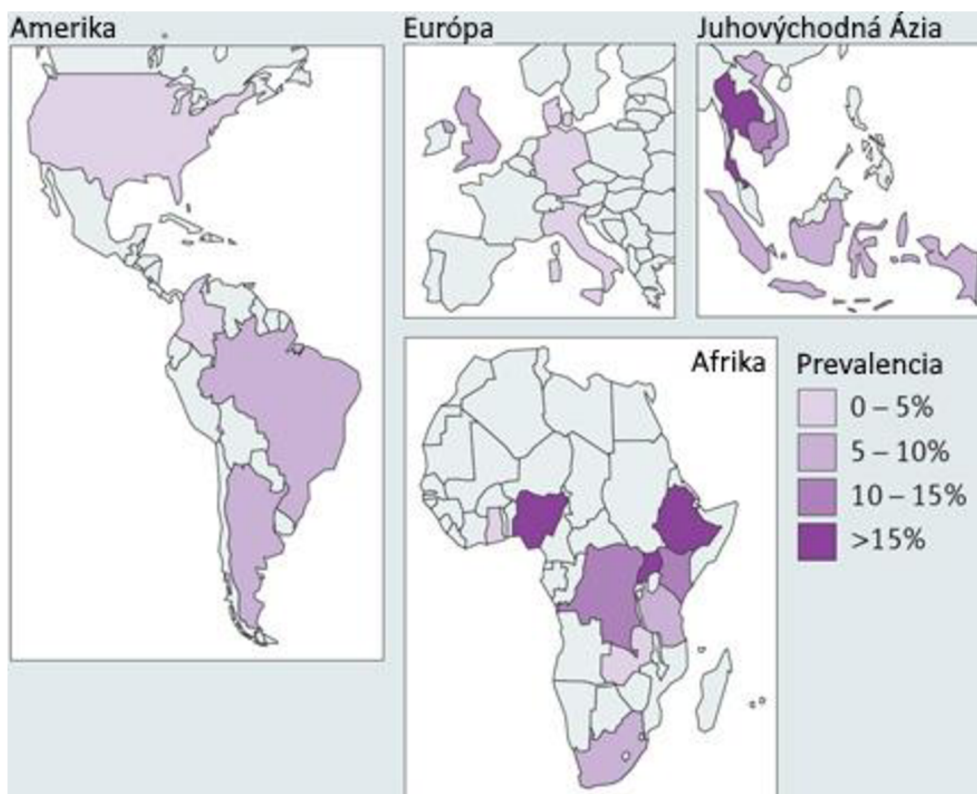
Kvasinky rodu *Cryptococcus* sa všeobecne vyskytujú ako saprofyty v pôde, prachu a na rôznych rastlinách, no často ich je možné nájsť aj v tráviacom trakte teplokrvných zvierat [18]. Medzi druhy vyskytujúce sa v pôde patria napríklad *Cryptococcus albidus* (*Naganishia albida*), *C. diffiuens* (*Naganishia diffluens*) a *C. terreus* (*Solicoccozyma terreus*). Tieto kvasinky

sú opúzdrené a ako zdroj dusíka využívajú dusičnany prítomné v pôde [19]. Podľa Di Menna môžu tieto kvasinky vďaka prítomnej kapsule priľnúť na povrch článkonožcov a červov, a tak sa šíriť pôdou. *C. albidus* patrí medzi patogénne kvasinky a je využívaná v poľnohospodárstve. Používa sa ako biologický kontrolný agens proti plesniam citrusov a jadrového ovocia [5]. Medzi ďalšie kapsulovité pôdne saprofyty patrí druh *C. wieringae* (*Filobasidium wieringae*), ktorý bol pôvodne identifikovaný ako *C. albidus* (*Naganishia albida*). Od *C. albidus* sa odlišuje schopnosťou utilizovať galaktózu alebo galaktitol. Ďalšími druhmi, ktoré boli nájdené v pôde sú *C. aerius* (*Solicoccozyma aerea*), *C. terricola* (*Solicoccozyma terricola*) a *C. podzolicus* (*Saitozyma podzolica*) [20]. Na rozdiel od ostatných pôdnych saprofytov, bunka *C. aerius* nie je obalená kapsulou. Vďaka produkcii enzýmu amyláza, ktorý štiepi škrob, má tento druh kvasiniek biotechnologický potenciál [5]. V 2005 zistil Shafiee a kol., že schopnosť týchto kvasiniek štiepiť škrob sa zvyšuje, keď sú tieto kvasinky kultivované spolu so *Saccharomyces cerevisiae* [21]. Biotechnologické využitie má taktiež druh *C. terricola*. Tieto kvasinky sú schopné priamo asimilovať škrob ako zdroj uhlíka a produkujú vybrané mastné kyseliny, ktoré môžu byť ďalej použité na výrobu biopalív [22]. *C. podzolicus* sa od iných druhov kvasiniek rodu *Cryptococcus* odlišuje pretiahnutým tvarom svojich buniek. Vyznačuje sa schopnosťou utilizovať aromatické zlúčeniny, akými sú galát, gentizát alebo katechol [23]. Z biotechnologického hľadiska vykazuje epoxid–hydrolázovú aktivitu, ktorá môže mať uplatnenie pri biotransformáciach počas výroby epoxidov [24].

Ďalšie druhy sa vyskytujú na nadzemných častiach rastlín- na kvetoch, či listoch a často sú asociované s odumierajúcimi časťami rastlín [20]. Medzi tieto druhy patrí *C. carnescens* (*Vishniacozyma carnescens*), *C. laurentii* (*Papiliotrema laurentii*), *C. flavescens* (*Papiliotrema flavescens*), *C. magnus* (*Filobasidium magnum*) a *C. oeirensis* (*Filobasidium oeirense*) [25]. *C. carnescens* je druh, ktorý má rovnaké fyziologické vlastnosti, ako *C. laurentii*. Odlišujú sa však schopnosťou asimilovať etanol a kreatinín [5]. *C. laurentii* patrí medzi patogénne druhy. V poľnohospodárstve je využívaný ako antagonista rastu plesní na skladovanom ovocí [26]. Druhy *C. magnus* a *C. oeirensis* majú rovnaké mikrobiologické vlastnosti a na ich odlišenie sa využívajú metódy sekvenácie genómu. Biotechnologické využitie kvasiniek rodu *C. magnus* nie je úplne preskúmané. *C. magnus* je schopný hydrolyzovať kazeín, karboxymetylcelulózu alebo kyselinu polygalakturónovú [25].

Z dnes známych druhov kvasiniek rodu *Cryptococcus* sa len niekoľko radí medzi ľudské patogény. Tie vyvolávajú ochorenie kryptokokózy. Okrem uvedených *C. albidus* a *C. laurentii*, patrí medzi oportunistický patogén, ohrozujúci imunokompromitovaných pacientov, druh

C. neoformans. Tento patogén infikuje ročne viac ako 1 milión pacientov s AIDS, ktorí zomierajú v priebehu niekoľkých mesiacov po stanovení diagnózy [27]. Vo vyspelých krajinách sa výskyt tohto patogénu znížil zavedením antiretrovírusovej terapie. Hlavným problémom ostáva jeho výskyt v rozvojových krajinách, akými sú Subsaharská Afrika, Ázia, či Pacifik [28]. Výraznejší geografický dopad má patogén *C. gattii*, ktorý patrí medzi pôvodcov endemických mykóz [29]. Najčastejšie sa vyskytuje v tropických a subtropických oblastiach, akými sú Austrália a Papua Nová Guinea, avšak sú známe prípady aj zo západného pobrežia Kanady a USA (Obrázok 2) [30].

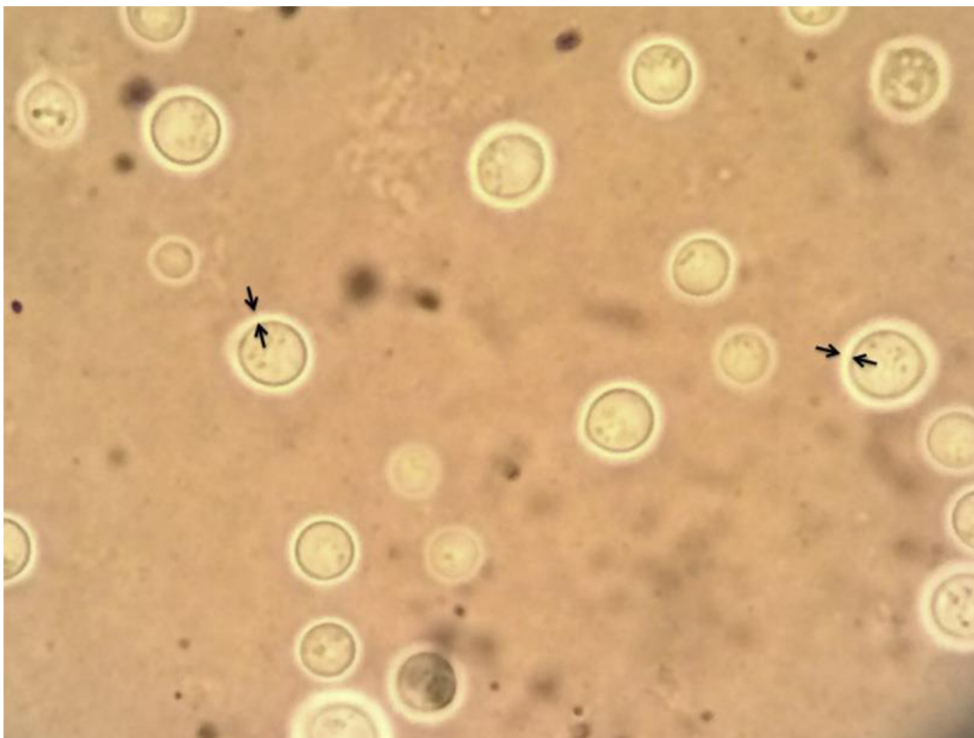


Obrázok 2: Rozšírenie kryptokokovej infekcie [13].

Prenos infekcie z človeka na človeka, ako aj z teplotných zvierat na človeka je veľmi zriedkavý [31; 32]. Najčastejším zdrojom infekcie je prostredie. Primárnym zdrojom *C. gattii* sú stromy – eukalyptus, červený céder a iné [33; 34]. Ďalším zdrojom infekcie sú pôda, voda a vzduch v endemických oblastiach, akými sú Austrália, Nový Zéland, Papua Nová Guinea, Severná a Stredná Amerika a časti Južnej Ameriky [30; 31; 32; 33; 34]. V Európe bol *C. gattii* prvýkrát detekovaný v povodí Stredozemného mora na stromoch olivovníka a eukalyptu [35]. *C. neoformans* je rozšírený po celom svete a primárnym zdrojom nákazy je holubí trus, ako aj exkrementy hmyzu [36].

2.1.3 Diagnostika

Diagnostika kryptokokózy závisí od mnohých faktorov. Medzi inými napríklad od detekcie samotného mikroorganizmu alebo polysacharidu GMX prítomného v sére alebo v cerebrospinálnej tekutine. Tento polysacharid je uvoľňovaný z kapsuly kryptokoka [37]. Diagnóza si zvyčajne vyžaduje kombináciu mikrobiologických a rádiografických vyšetrení. Mikrobiologické vyšetrenie je pre určenie diagnózy kľúčové, pričom dôležité je aj rádiografické zobrazenie pľúc, ktoré môže v diferenciálnej diagnostike spolu s príznakmi potvrdiť kryptokokovú infekciu [38]. Pri mikrobiologickom vyšetrení môže byť patogén identifikovaný prostredníctvom priameho natívneho preparátu; preparátu, v ktorom sú farbením zvýraznené kapsule alebo imunofluorescenčným farbením. Avšak táto metóda nedokáže rozlíšiť životaschopné a odumreté bunky (Obrázok 3) [29].



Obrázok 3: Bunky Cryptococcus vizualizované tušovým farbením. Šípky zobrazujú kapsulu bunky [38].

Pacient môže byť vyšetrený aj prostredníctvom sérologického vyšetrenia. V tomto vyšetrení ide o detekciu kryptokokového polysacharidového antigénu v telesných tekutinách a môže byť prevedené rôznymi imunologickými metódami [39; 40]. Najbežnejšie je použitie komerčného testu, ktorý využíva na detekciu latexovú aglutinačnú techniku. Detekovaný je GXM a test využíva častice potiahnuté anti-GXM monoklonálnymi protilátkami. Ak dôjde k reakcii medzi značenými časticami a GXM, test je pozitívny. Aktívna infekcia však musí byť ešte potvrdená

mikrobiologickým stanovením [41]. V posledných rokoch sa rozmohlo používanie testu založeného na laterálnej prietokovej imunochromatografii, pretože je tento test lacnejší a citlivejší, ako skoršie sérologické testy [37]. Ak sú vyššie uvedené testy negatívne, avšak klinické podozrenie stále pretrváva, je potrebné zvážiť ďalšie diagnostické testovanie. Tým môže byť napríklad biopsia pľúcneho tkaniva s následným mikrobiologickým stanovením, ktoré zahŕňa kultivačné vyšetrenie a vyšetrenie metabolických vlastností [38]. Je veľmi dôležité diagnostikovať typ infekcie, pretože od neho sa odvíja druh liečby.

2.1.4 Liečba

Antimykotická liečba nie je potrebná u všetkých pacientov. Niektorí pacienti, ktorí majú minimálne množstvo kryptokokových pľúcnych uzlín a sú asymptotickí, nepotrebujú liečbu. Naopak u imunokompromitovaných pacientov s pľúcnou infekciou je liečba žiaduca [42].

Infekcie vyvolané patogénom *C. neoformans* sú liečené rôzne. Imunokompromitovaných pacientov, u ktorých bola zistená kryptokoková pneumónia, je možné liečiť iba pomocou antimykotika fluconazol. Najskôr však musí byť vylúčené preniknutie patogénu do centrálného nervového systému (CNS) [42; 43]. V prípade pľúcnej infekcie spojenej s infekciou CNS je potrebná agresívnejšia liečba, ktorej súčasťou je intravenózne podávanie deoxycholátu amfotericínu B s intravenóznym alebo perorálnym podávaním flucytozínu. Po tejto liečbe nasleduje terapia fluconazolom, ktorý má minimálnu toxicitu a výbornú penetráciu do CNS. U imunokompetentných pacientov s miernou pľúcnou infekciou je základom liečby denné užívanie fluconazolu. Pri rozsiahlejších infekciách sa k liečbe pridáva amfotericín B a flucytozín [42; 43].

Liečba miernych infekcií vyvolaných *C. gattii* je rovnaká, ako liečba miernych infekcií vyvolaných *C. neoformans*. Závažnejšie infekcie sú liečené rovnakými terapeutikami, ako infekcie vyvolané *C. neoformans*, avšak je odporúčaná dlhšia doba terapie. V posledných rokoch patrí medzi hlavné komplikácie, spojené s liečbou, rezistencia patogénov voči kľúčovým antimykotikám. Ako alternatívne terapeutiká sú dnes využívané antimykotiká itrakonazol a voriconazol [43].

2.2 Metódy identifikácie kvasiniek

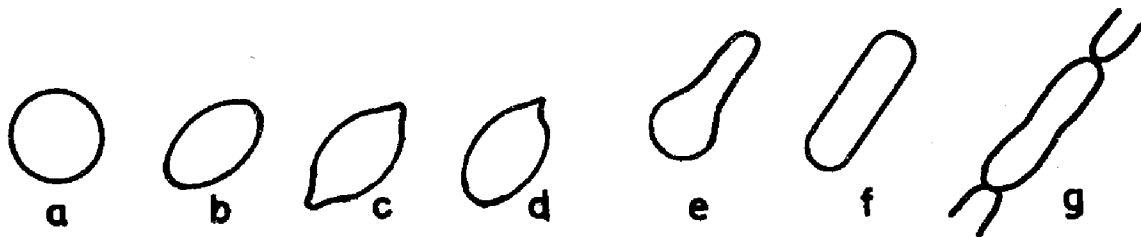
2.2.1 Mikrobiologické metódy

Mikrobiologické metódy využívajú stanovenie na základe fyziologických, morfológických a biochemických vlastností. Medzi tieto vlastnosti patria veľkosť a tvar bunky, sporulácia, zloženie buniek, antigenicita, biochemická aktivita a citlivosť na antimikrobiálne činidlá.

Stanovenie často závisí od použitých médií a rastových podmienok. Zahŕňa reakcie na rôzne chemikálie alebo rôzne biochemické markery, čo predstavuje určité nevýhody pri dosahovaní opakovateľnej a reprodukovateľnej identifikácie [44].

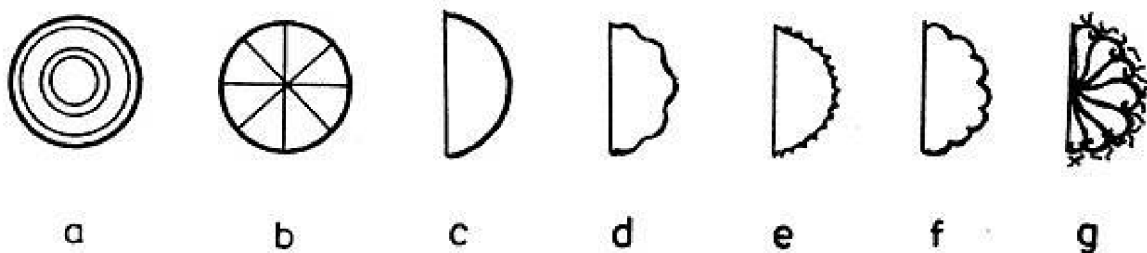
Stanovenie na základe veľkosti a tvaru buniek

Kvasinky sa vyznačujú bunkami s veľkosťou 5-8 μm , ktoré tvoria zriedka filameny. Môžu vytvárať rôzne typy kolónií, ktoré sa líšia svojím tvarom, veľkosťou, ako aj svojím profilom. Základným tvarom, ktoré bunky vytvárajú, je rotačný elipsoid. Bunky taktiež môžu byť elipsovité, oválne, valcovité, citrónovité, vláknité a iné (Obrázok 4) [5; 45].



Obrázok 4: Tvary kvasinkových buniek: a) guľovitý, b) elipsoidný, c) citrónovitý, d) ogiválny, e) fľaškovitý, f) pretiahnutý, g) vláknitý [45].

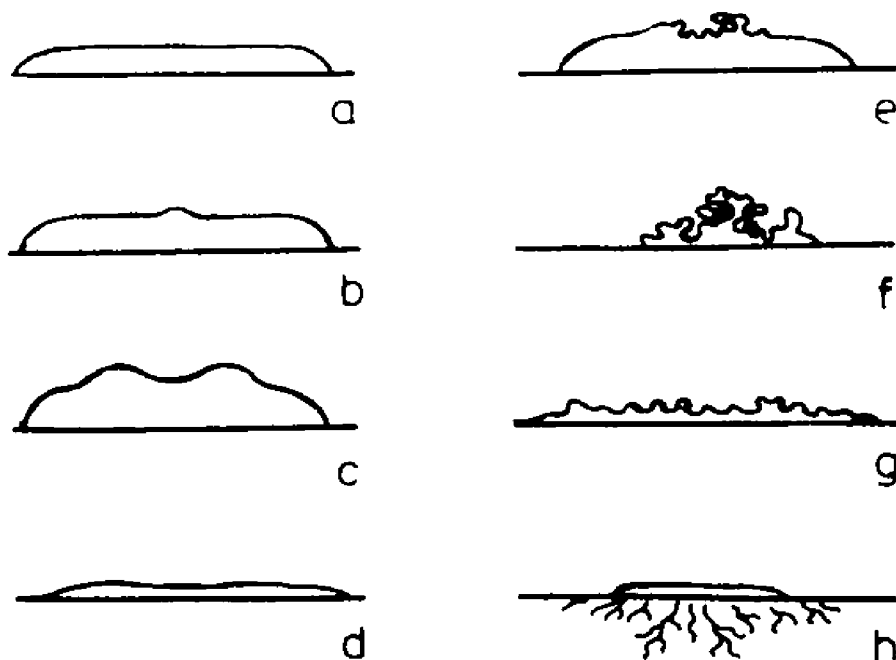
Na tvar buniek vplýva spôsob vegetatívneho rozmnožovania, no často je závislý aj od druhu alebo kmeňa. Morfológiu buniek do značnej miery určuje okolité prostredie [5; 45]. Vzhľad kolónií na pevnom médiu je druhovo a rodovo špecifický a môže byť popísaný z niekoľkých hľadísk. Väčšina druhov má hladký povrch kolónií, ktorý je podobný povrchu väčšiny baktérií. Pozorovaný môže byť aj slizovitý alebo drsný povrch [45]. Medzi ďalšie charakteristiky patrí tvar a ryhovanie okraja kolónií, ktoré sú zhrnuté na Obrázku 5 [45].



Obrázok 5: Tvar okrajov a ryhovanie povrchu kvasinkových kolónií: a) centrálné ryhovanie, b) radiálne ryhovanie, c) celistvý okraj, d) zvlnený okraj, e) pilovitý okraj, f) cípovitý okraj, g) koreňkový okraj [45].

Pri priereze kolónií sledujeme rôzne tvary, ktoré sú zhrnuté na Obrázku 6 [46]. Ďalšou základnou vlastnosťou kvasinkovej kultúry je pigmentácia. Farbu buniek môžeme sledovať

počas rastu obrovských kolónií – krémová (*S. cerevisiae*), biela (*Geotrichum candidum*), čierna (*Aureobasidium pullulans*), ružová (*Phaffia rhodozyma*), červená (*Rhodotorula rubra*), oranžová (*Rhodosporidium*) a žltá (*Cryptococcus laurentii*). Pigmenty niektorých kvasiniek majú biotechnologické využitie – napríklad astaxantín z *P. rhodozyma* je využívaný ako doplnok výživy pri chove lososov [47].



Obrázok 6: Typy profilov kvasinkových kolónií: a) hladký, b) hladký s vyvýšeným stredom, c) hladký kráterovitý, d) plochý, e) kráterovitý s kučeravým stredom, f) kučeravý vyvýšený, g) kučeravý plochý, h) koreňkový s pseudomycéliom [46].

Stanovenie konštanty radiálneho rastu

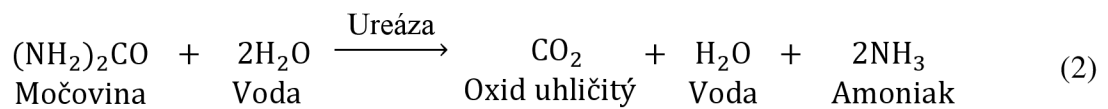
Ďalším spôsobom identifikácie kvasiniek je ich odlišenie na základe rôznej rýchlosti rastu na tuhom médiu, ktorú udáva konštanta radiálneho rastu. Tú je možné zistiť sledovaním pozdĺžneho rastu, pričom je zaznamenávaný priemer kvasinkovej kultúry. Konštanta radiálneho rastu je následne vypočítaná podľa nasledujúceho vzorca (1). Pri tomto stanovení je dôležité, aby vzorka počas celého sledovania nebola kontaminovaná.

$$[(r_t - r_0)] \cdot 100(\text{mm}/100 \text{ hod}) \quad (1)$$

r_t – priemer kultúry po 21 dňoch, r_0 – priemer kultúry na začiatku stanovenia

Stanovenie prítomnosti ureázy

Močovina je dusíková zlúčenina, ktorá je produkovaná počas dekarboxylácie aminokyseliny arginínu v močovinovom cykle. Vďaka svojej enzymatickej aktivite, je pre ľudské bunky vysoko toxická. Je rozpustná vo vode a vďaka tomu je z tela vylučovaná obličkami ako súčasť moču. Pomocou ureázového testu sa stanovuje schopnosť organizmu štiepiť močovinu prostredníctvom intracelulárneho enzýmu ureázy. Močovina je produkt dekarboxylácie aminokyselín a jej hydrolýzou vzniká amoniak a karbamát, ktorý sa následne rozkladá na kyselinu uhličitú a druhú molekulu amoniaku [5]. Vznikajúci amoniak alkalizuje médium a zvýšenie pH je detekované farebnou zmenou indikátora fenolovej červene zo svetlooranžovej (pH 6,8) na ružovú (pH 8,1) (2) [48].



V spojení so stanovením morfológických vlastností, je ureázový test využívaný na odlišenie niektorých významných rodov kvasiniek od ostatných rodov – rodov *Cryptococcus*, *Trichosporon* a menšej miere aj rodu *Rhodotorula* [49]. Tieto rody kvasiniek vykazujú pozitívnu zmenu. Naopak u askomycétnych kvasiniek, ako sú rody *Candida* a *Saccharomyces*, je ureázový test negatívny [5].

Stanovenie asimilácie a fermentácie cukrov

Tento test je nazývaný auxanogram a stanovuje schopnosť kvasiniek využívať karbohydráty ako jediný zdroj uhlíka, prípadne zdroje dusíka. V tomto teste je sledovaný rast mikroorganizmov, ktorý je kvantitatívnym a kvalitatívnym ukazovateľom aeróbného využitia uhlíka ako jediného zdroja metabolického procesu [50]. Ako zdroje uhlíka môžu byť využité glukóza, sacharóza, maltóza, laktóza, celulóza, rafinóza, trehalóza, a iné [51].

Je mnoho techník používaných na toto stanovenie. Jednou z možností je využitie konvenčnej Wickerhamovej bujónovej techniky [52]. Pri tomto stanovení je kultúra kvasiniek, ktorá bola predtým zbavená živín, naočkovaná na Wickerhamovo tekuté médium. Rast je sledovaný po dobu 48 hodín a meraný na základe zakalenia roztoku. Často sa pri tomto stanovení preočkávajú kvasinkové kultúry zo živného média, preto je potrebné porovnať vzorky s negatívnou kontrolou, aby sa predišlo skresleným výsledkom. Túto techniku už v súčasnosti nahradili pokročilejšie metódy, pretože väčšina Wickerhamových médií nie je komerčne dostupná a ich príprava je časovo náročná [53; 54]. Ďalšia technika využíva šikmý agar a ako indikátor brómkrezolovú modrú. Ak mikroorganizmus daný cukor využije, dochádza

k produkcii kyselín, ktoré menia pH prostredia v dôsledku čoho dochádza k zafarbeniu pôdy [55]. Pokročilejšou a praktickejšou technickou je auxanografická metóda (Dye Pour-Plate Auxanogram, DPPA), ktorou je možné sledovať asimiláciu 14 cukrov v kvasinkách naraz na jednej platni namiesto viacerých skúmaviek. Pri tejto metóde sú kvasinky nanášané na Petriho misku a v médiu je daný sacharid, alebo je suspenzia kvasinky vliata do média v sterilnom prostredí a následne sú na agar umiestnené papierové disky napustené daným sacharidom (s koncentráciou 10%). K lepšej interpretácii výsledkov sa používa pH indikátor [54].

Fermentačný test je nazývaný zymogram a je založený na sledovaní produkcie plynov vznikajúcich pri fermentácii sacharidov prostredníctvom kvasiniek. Proces fermentácie je základný metabolický spôsob získavania energie. Glukóza je v glykolýze postupne metabolizovaná na pyruvát, ktorý kvasinky pri anaeróbných podmienkach premieňajú na etanol v procese etanolového kvasenia za súčasného vzniku CO₂ [56]. Na detekciu vznikajúceho oxidu uhličitého sa najčastejšie využíva Durhamova plynová skúmavka, ktorá obsahuje roztok sacharidu s koncentráciou 2% [5]. Použitie základné médium, v ktorom sú rozpustené fermentované sacharidy, musí obsahovať dostatočné množstvo živín. Tieto živiny sú dôležité hlavne pre syntézu enzýmov zapojených do transportu a hydrolýzy karbohydrátov. Základné médium taktiež nesmie obsahovať stopy fermentujúcich cukrov z dôvodu eliminácie falošne pozitívnych výsledkov [5].

Stanovenie citlivosti na antimykotiká

Stanovenie citlivosti na antimykotiká patrí medzi základné mikrobiologické metódy stanovenia. Toto stanovenie je dôležité hlavne pre určenie správnej liečby danej infekcie. Výber antimykotika závisí od druhu kvasiniek. Často využívanou látkou pri stanovení je antibiotikum actidion, nazývané taktiež cykloheximid. Cykloheximid je jediné antibiotikum, ktorého spektrum aktivity zahŕňa aj určité druhy kvasiniek [57]. Je produkované baktériou *Streptomyces griseus* a mechanizmus účinku zahŕňa inhibíciu syntézy bielkovín prostredníctvom imobilizácie ribozómov pri elongácii translácie [58; 59]. V tejto práci sú ďalej využívané antimykotiká fluconazol a voriconazol. Fluconazol je fluór substituované bis-triazolové antimykotikum, ktoré je selektívny inhibítor enzýmu lanosterol 14- α -demetyláza závislého od cytochrómu P450. Za normálnych podmienok tento enzým katalyzuje premenu lanosterolu na ergosterol, ktorý je potrebný na syntézu bunkovej steny. Voľný atóm dusíka, ktorý sa nachádza na azolovom kruhu fluconazolu, sa viaže na jediný atóm železa, ktorý sa nachádza v hmovej skupine enzýmu lanosterol 14- α -demetyláza. Následkom inhibície je zastavenie

biosyntézy ergosterolu, ktoré vedie k hromadeniu metylovaných sterolov v membráne, čo zastavuje rast húb [60]. Nahromadené steroly majú tiež negatívny vplyv na štruktúru a funkciu plazmatickej membrány buniek húb [61]. Voriconazol je triazolové antimykotikum, ktoré má podobnú štruktúru ako fluconazol. Hlavným rozdielom medzi týmito dvoma antimykotikami je, že voriconazol obsahuje vo svojej štruktúre triazolovú skupinu a fluconazol fluórpyrimidínovú skupinu [62].

Sledovanie rastu bez prítomnosti vitamínov

Test sledovania rastu bez vitamínov je využívaný na klasifikáciu kvasiniek podľa nárokov na výživu. Prototrofný kmeň kvasiniek si dokáže vyprodukovať všetky potrebné vitamíny a iné rastové faktory potrebné pre rast. Naopak auxotrofný kmeň kvasiniek je závislý na rastových faktoroch dodaných do média [5]. Stanovenie požiadaviek na vitamíny je založené na schopnosti kvasiniek rásť v kompletnom minerálnom médiu bez prítomnosti vitamínov. Test spočíva v naočkovaní kultúry do skúmavky s minimálnym médiom. V tomto médiu počas prvého týždňa ešte kvasinky dokážu rásť vďaka bunkovým zásobám. Následne na konci prvého týždňa sa kvasinková suspenzia preočkováva do druhej skúmavky s minimálnym médiom a sleduje sa rast kvasinkovej kultúry ďalší týždeň [5].

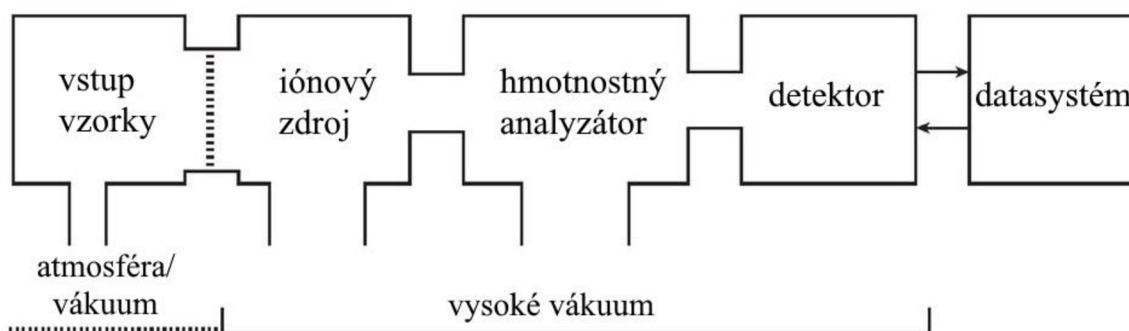
2.2.2 Molekulárne metódy

V súčasnosti najrozšírenejšou molekulárnou technikou identifikácie kvasiniek je metóda využívajúca polymerázovú reťazovú reakciu (PCR). Jej princípom je *in vitro* amplifikácia špecifickej sekvencie DNA pomocou DNA polymerázy. Amplifikácia je založená na replikácii dvojreťazcového templátu DNA a je rozdelená do troch fáz: denaturačnej fázy, hybridizačnej fázy s primermi a elongačnej fázy [63]. Denaturácia dvoch reťazcov DNA prebieha pri denaturačnej teplote 94 °C. Po denaturácii prvých molekúl pokračuje reakcia hybridizačnou fázou, v ktorej na rozpletené reťazce DNA nasadajú primery (krátke jednovláknové sekvencie DNA komplementárne s templátom) a syntetizujú sa nové molekuly. Hybridizácia prebieha pri teplote 40 a 70 °C. Elongácia prebieha pri 72 °C. Táto teplota je dôležitá, pretože umožňuje správne fungovanie termostabilnej DNA polymerázy. Tento enzým pripája nukleotidy k 3' koncu primeru, čím je syntetizované nové komplementárne vlákno DNA. Celá PCR reakcia je rýchla a trvá niekoľko hodín [64]. Produkt PCR je následne detekovaný ďalšími metódami, pričom najjednoduchšou a najpoužívanejšou je gélová elektroforéza. Táto metóda oddeľuje DNA produkty na základe veľkosti a náboja [65].

2.2.3 Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria (Mass spectrometry, MS) je analytická metóda založená na generovaní iónov z anorganických alebo organických zlúčenín a ich následnej separácii na základe pomeru hmotnosti k náboju (*mass-to-charge ratio*, m/z) [66]. Vďaka pomeru m/z a relatívnemu zastúpeniu môžeme zisťovať kvalitatívne a kvantitatívne vlastnosti vzoriek. Metóda sa využíva napríklad na zisťovanie chemickej štruktúry látok, zloženie látok alebo ich identifikáciu. Z fyzikálneho hľadiska spočíva táto metóda v interakcii iónov s elektrickým a magnetickým poľom, avšak v súčasnosti je vďaka preletovému analyzátoru (time-of-flight, TOF) možná separácia iónov aj v oblasti bez poľa. Limitujúcim faktorom je, že ióny musia mať pri vstupe do analyzátoru dobre definovanú kinetickú energiu [67].

Hmotnostný spektrometer pozostáva z iónového zdroja, hmotnostného analyzátoru, detektora a datasystému, ktorý spracováva signál z detektora. Prístroj taktiež obsahuje vákuový systém, ktorý zabezpečuje dostatočné vákuum v hmotnostnom spektrometri (Obrázok 7) [67].

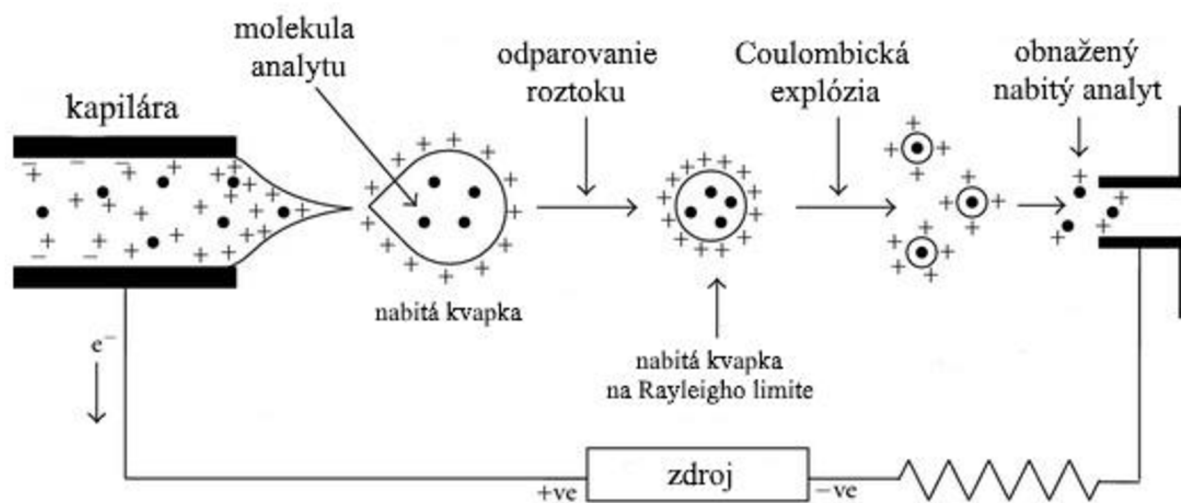


Obrázok 7: Základné usporiadanie hmotnostného spektrometra [67].

Metódy ionizácie

V iónovom zdroji dochádza k iónizácii analytu a prevodu vzorky do plynnej fázy. Analyt môže byť ionizovaný rôznymi spôsobmi, avšak všeobecne sa ionizačné techniky delia na mäkké a tvrdé. Toto rozdelenie súvisí s množstvom dodanej energie pri ionizácii. Pri mäkkých ionizačných technikách je dodaný prebytok energie malý, preto je malá aj pravdepodobnosť fragmentácie. Tvrdé ionizačné techniky sa vyznačujú dodaným prebytkom energie, ktorý je postačujúci k rozsiahlej fragmentácii primárneho iónu [68]. Tvrdou ionizačnou technikou je elektrónová ionizácia, pri ktorej prechádza lúč urýchlených elektrónov vzorkou a zráža sa s neutrálnymi molekulami analytu, pričom dochádza k vzniku kladne nabitých iónov alebo fragmentov (menších nabitých alebo nenabitých častí). Používa sa na prchavé vzorky, ktoré nie sú citlivé na teplo a majú nízku molekulovú hmotnosť. Je to jedna z najstarších metód ionizácie

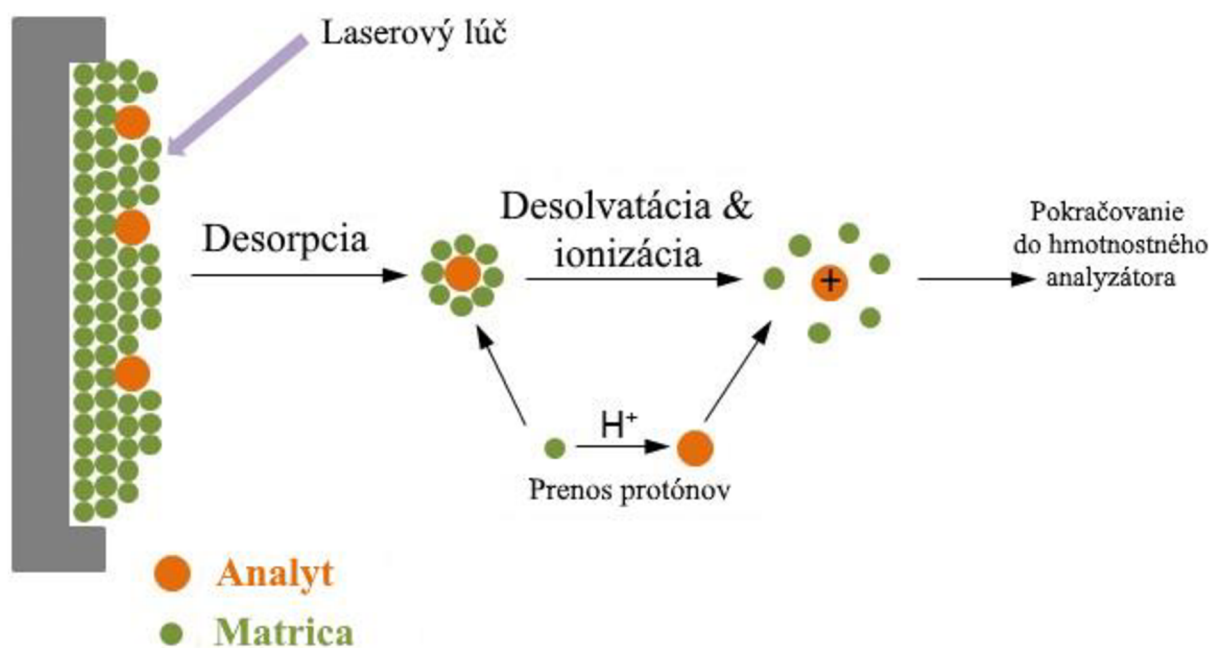
a jej výhodou je možnosť tvorby knižníc spektier [69; 70]. Pre rovnaký typ vzoriek sa využíva aj chemická ionizácia, ktorá patrí medzi mäkké ionizačné techniky. Pozostáva z dvoch krokov: v prvom dochádza k interakcii elektrónov s reakčným plynom a v druhom k ionizácii molekúl analytu produktami ionizácie reakčného plynu. Oproti elektrónovej ionizácii, pri tejto technike nedochádza k rozsiahlej fragmentácii, dochádza však k vzniku kvázimolekulárnych iónov $[M+H]^+$. Jej nevýhodou je nemožnosť tvorby knižníc spektier [70]. Medzi ďalšie mäkké ionizačné techniky patrí ionizácia elektrosprejom (ESI), pri ktorej sú ióny prevádzané z kvapalnej do plynnej fázy. Spolu s technikou MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization, desorpčná ionizácia laserom za účasti matrice) je využívaná hlavne na analýzu biologických vzoriek [71; 72]. Pri ionizácii elektrosprejom je rozpustený analyt privádzaný kapilárou, ktorá je vystavená silnému elektrickému poľu. Po rozprášení nabitých kvapiek vzorky dochádza postupne k odparovaniu rozpúšťadla, čím sa zvyšuje hustota povrchového napätia na kvapkách. Po dosiahnutí Rayleighho limitu dochádza ku Coulombickej explózii, rozpadu kvapky na menšie nabité kvapôčky. Opakovaním procesu sú uvoľňované kvázimolekulárne ióny (Obrázok 8) [69; 70].



Obrázok 8: Schéma ionizácie elektrosprejom [73].

Ďalšou mäkkou ionizačnou technikou používanou na biologické molekuly je MALDI. Počas tejto metódy je analyt rozpustený v roztoku matrice, ktorej súčasťou je chromofor, ktorý absorbuje fotóny len pri určitej vlnovej dĺžke lasera. Malé množstvo tejto matrice sa umiestni na platničku. Následne je energia laserového pulzu absorbovaná matricou a dochádza k produkcii plazmy, ktorej výsledkom je odparovanie a ionizácia molekúl analytu (Obrázok 9) [69; 74]. Na rozdiel od ostatných metód, MALDI je pulznou metódou, ktorá umožňuje tvorbu

knižníc. MALDI nie je vhodná pre zlúčeniny s nízkou molekulovou hmotnosťou. Dôležitý je výber matrice, ako aj príprava vzorky. Limitujúcim krokom je aj výber analyzátora. Zatiaľ čo ESI môže byť spojený s akýmkoľvek analyzátorom, MALDI vyžaduje použitie TOF analyzátora, ktorý je schopný analyzovať veľký rozsah hmotností. Nedávne štúdie však ukázali úspešné použitie trojitého kvadrupólu na analýzu malých molekúl [75; 76]. Existuje mnoho ďalších techník ionizácie, napríklad ako je chemická ionizácia za atmosférického tlaku, fotoionizácia za atmosférického tlaku alebo ionizácia pomocou indukčne viazanej plazmy, ktorá sa využíva pre prvkovú analýzu.



Obrázok 9: Mechanizmus MALDI [77].

Analyzátory

Hlavnou úlohou analyzátora je separácia iónov na základe ich pomeru hmotnosti k náboju. Na separáciu využíva statické, prípadne dynamické, elektrické alebo magnetické pole, či ich kombináciu [70]. Základným parametrom hodnotenia analyzátorov je ich rozlišovacia schopnosť, ktorá sa získava zo šírky píku v špecifickom percentuálnom vyjadrení výšky píku vyjadrenej ako funkcia hmotnosti [78].

Medzi historicky prvé analyzátory patrí *magnetický analyzátor*. Princípom tohto analyzátora je, že pri prechode iónu magnetickým poľom dochádza k zakriveniu dráhy daného iónu, pričom ióny s rôznym m/z majú rozdielne zakrivenia dráhy letu. Na základe dostredivej a odstredivej sily, ktoré na ión v magnetickom poli pôsobia, vieme vypočítať polomer dráhy, ktorú daný ión opisuje [67]. V súčasnosti najviac rozšíreným hmotnostným analyzátorom je *kvadrupól*, ktorý

funguje na princípe elektrostatického priťahovania a odpudzovania. Skladá sa zo 4 vodivých tyčí, do ktorých je privádzané striedavé a jednosmerné napätie. Po vlietnutí iónu dochádza v analyzátore k elektrostatickému priťahovaniu a odpudzovaniu iónov a tyčí kvadrupólu, čím sa medzi tyčami mení pohyb iónov. V určitom momente sa ióny s určitou hodnotou m/z pohybujú po stabilnej trajektórii k detektoru. Ióny s nestabilnou trajektóriou narazia do tyče a nie sú detekované [67] [70]. Medzi výhody týchto analyzátorov patrí, že majú vysokú priepustnosť, sú ľahké, kompaktné, lacné a taktiež vyžadujú nízke napätie na urýchlenie iónov [67]. Na princípe kvadrupólu funguje aj *3D iónová pasca* nazývaná taktiež kvadrupólová iónová pasca. Je tvorená prstencovou elektródou a dvoma kryciami elektródami. Počas pulzovania elektrického poľa dochádza k priťahovaniu a odpudzovaniu iónov. Výsledkom toho sú ióny s určitým m/z , vytvárajúce stabilné trajektórie, zachytené v iónovej pasci. Následne dochádza k vymršteniu iónov do detektora [79]. Tento typ analyzátora sa najčastejšie používa v GC-MS (plynová chromatografia s hmotnostným spektrometrom) systémoch v spojení s chemickou alebo elektrónovou ionizáciou, pretože je to lacné a pri tejto metóde zlepšujú selektivitu analýzy. V súčasnej dobe je často využívaným analyzátorom *lineárna iónová pasca*, ktorá je kombináciou klasického kvadrupólu a iónovej pasce. V tomto type analyzátora sa vytvára elektrické pole, ktoré pôsobí ako iónová brána, ktorá ióny zachytáva a nepúšťa ďalej [67]. Elektrostatickou iónovou pascou je analyzátor *orbitrap*, ktorý funguje na princípe fourierovej transformácie. Orbitrap je tvorený vnútornou prstencovou elektródou, ktorá je obklopená snímacími elektródami, ktoré vytvárajú napätie. Ióny zachytené v analyzátore vytvárajú okolo prstencovej elektródy axiálny pohyb, ktorý indukuje na vonkajších elektródach prúd. Hmotnostné spektrum je následne získané fourierovou transformáciou [69; 80]. Fourierovu transformáciu využíva taktiež iónová *cyklotronová rezonancia s Fourierovou transformáciou (FT-ICR)*. Tento analyzátor je cela, v ktorej je m/z iónov stanovený z ich cyklotronovej frekvencie v silnom magnetickom poli. Silné magnetické pole spôsobuje, že ióny sa v cele pohybujú po kružnici. Následne dochádza k ich excitácii pôsobením rádiových vln a takýto cirkulujúci ión vytvára "image current". Výsledné hmotnostné spektrum sa získava opäť fourierovou transformáciou [67; 69]. Najrýchlejším analyzátorom je *TOF analyzátor*, ktorý stanovuje m/z iónov z doby letu. V TOF analyzátore sú ióny s rôznym m/z počas letu rozptýlené po trubici bez elektrického poľa (tzv. driftová zóna) s dĺžkou 1 m. Ióny musia vletieť zo zdroja do driftovej zóny v rovnakom čase, pričom ľahšie ióny dorazia k detektoru skôr, ako ťažšie ióny. Z tohto dôvodu je pri tejto metóde potrebná pulzná ionizácia, pri ktorej je pre každý pulz zaznamenané celé spektrum. TOF analyzátory majú niekoľko výhod. Vďaka vysokej transmisii iónov majú vysokú citlivosť a sú veľmi

presné. Nakoľko zaznamenávajú spektrum pre každý pulz, majú krátku dobu záznamu spektra a jednoduchý dizajn [67].

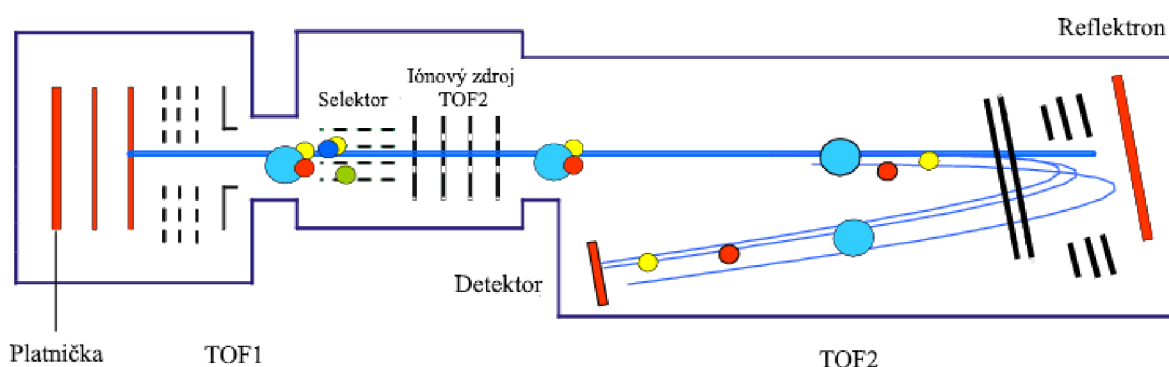
Detektory

Ióny putujú po separácii podľa m/z ďalej do detektora, kde sú detekované ich množstvá pre jednotlivé m/z . Detektor pracuje v podmienkach vysokého vákua a je dôležité, aby sa do neho dostali len analyzované ióny, nakoľko detekuje signál aj z energeticky neutrálnych častíc, elektrónov alebo protónov [67]. Detektory využívajú všetky analyzátory okrem orbitrapu a FT-ICR, v ktorých súčasne prebieha aj detekcia. V súčasnosti je známych mnoho detektorov, pričom najjednoduchším typom je Faradayova klieťka – elektróda, ktorá po dopade iónu indukuje prúd. Meraný a zosilnený prúd je priamo úmerný počtu zachytených iónov. Tento typ detektora je využívaný hlavne pri presných izotopových meraniach [67; 81]. Najbežnejším detektorom je elektrónový násobič, ktorý detekuje sekundárne elektróny. Keď nabitá častica narazí do povrchu kovu alebo polovodiča, dochádza k emisii sekundárnych elektrónov z povrchových atómov. Signál z týchto elektrónov je následne zosilnený a ďalej spracovaný. Nevýhodou týchto detektorov je ich obmedzená životnosť a nízka citlivosť. Počet uvoľnených sekundárnych elektrónov závisí od typu dopadajúcej primárnej častice, jej energie a charakteristiky povrchu [82; 83]. Ďalším typom detektora je fotonásobič, ktorý je schopný súčasne detekovať malé pomery m/z . Jedná sa o viackanálový detektor vysokej citlivosti. Ióny dopadajú na konverznú diódu, pričom dochádza k uvoľneniu elektrónov. Elektróny ďalej dopadajú na fosforovú doštičku za súčasného uvoľnenia fotónov, ktorých signál je zosilnený vo fotonásobiči [67].

Identifikácia kvasiniek pomocou MALDI-TOF

MALDI-TOF umožňuje presnú identifikáciu väčšiny grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií, ako aj vírusov [84]. Rovnako je využívaná pri identifikácii kvasiniek, kedy je táto technika rýchlejšia, ako konvenčné mikrobiologické metódy identifikácie. Spojenie so špecifickými štandardizovanými postupmi identifikácie umožňuje využitie MALDI-TOF pri identifikácii vláknitých húb a dermatofytov. Technika poskytuje charakteristické spektrá, tzv. „odtlačky prstov“ (fingerprints), ktoré sú pre každý mikroorganizmus jedinečné, čo umožňuje ich identifikáciu na úrovni rodu a druhu [85]. Kvôli štruktúre bunkovej steny kvasiniek je pri ich identifikácii dôležitá extrakcia intracelulárnych proteínov. Najčastejšie sú extrahované ribozomálne proteíny, pričom výber vhodného organického rozpúšťadla závisí od druhu. V súčasnosti je najviac využívaná extrakcia pomocou kyseliny mravčej [85].

V tejto práci sú vzorky identifikované pomocou hmotnostného spektrometra MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme od firmy Bruker, ktorý je zložený z dvoch TOF analyzátorov. V hmotnostnom spektrometri sú ióny desorbované a ionizované z platničky. Následne putujú do prvého TOF analyzátoru (TOF1), kde sú molekulové ióny separované podľa ich hmotnosti. Časť iónov podlieha v oblasti TOF1 fragmentácii indukovanej buď metastabilným laserom alebo kolíziou. Dôležité je, že fragmenty, ako aj ich prekurzory letia rovnakou rýchlosťou. Medzi TOF1 a TOF2 analyzátorom sa nachádza „brána“ (selektor), cez ktorú prejdú len ióny vybranej molekulovej hmotnosti. V TOF2 analyzátoze dochádza k urýchleniu iónov a ich opätovnej analýze a detekcii. TOF2 obsahuje reflekttron, ktorý sa používa na zvýšenie rozlíšenia hmotnostného spektra fragmentov (Obrázok 10) [86].



Obrázok 10: Schéma MALDI-TOF/TOF hmotnostného spektrometra [86].

Vyhodnotenie získaných spektier môže prebiehať dvoma spôsobmi. Prvým je porovnanie získaného spektra s knižnicou hmotnostných spektier a druhé je manuálne porovnanie získaného spektra so spektrom štandardu. Spektrá sú vyhodnocované pomocou počítačových programov a porovnanie prebieha na základe tzv. skóre zhody (Tabuľka 1).

Tabuľka 1: Skóre zhody pri identifikácii mikroorganizmov [87].

Rozsah	Interpretácia	Farba
2.00-3.00	Vysoká dôveryhodnosť identifikácie	Zelená
1.70-1.99	Nízka dôveryhodnosť identifikácie	Žltá
<1.70	Nie je možná žiadna identifikácia organizmu	Červená

3 CIELE PRÁCE

Táto diplomová práca sa venuje kvasinkám rodu *Cryptococcus* vyskytujúcich sa na lúčnych kvetoch rastúcich na lúkach a v záhradách a jej ciele sú nasledovné:

1. Identifikácia 79 vzoriek kvasiniek rodu *Cryptococcus* pomocou metódy MALDI-TOF MS.
2. Sledovanie vplyvu dvoch kultivačných médií na meranie a výsledky identifikácie metódou MALDI-TOF MS.
3. Porovnanie metodík spracovania vzorky pre meranie pomocou MALDI-TOF MS. Vzorky sú spracovávané 2 metódami - Brukerovou metódou a premývacou metódou.
4. Sledovanie závislosti zvolenej matrice od výsledných spektier vzoriek.
5. Stanovenie vybraných charakteristík týchto vzoriek prostredníctvom konvenčných mikrobiologických metód, akými sú:
 - Stanovenie konštanty radiálneho rastu
 - Stanovenie prítomnosti ureázy
 - Stanovenie fermentácie cukrov, pri ktorom je použitých 7 typov médií: médium s obsahom galaktózy, médium s obsahom glukózy, médium s obsahom laktózy, médium s obsahom maltózy, médium s obsahom rafinózy a médium s obsahom sacharózy.
 - Stanovenie asimilácie cukrov – sledovanými zdrojmi uhlíka sú galaktóza, inulín, laktóza, maltóza, melibióza, rafinóza, sacharóza a trehalóza.
 - Sledovanie vplyvu antibiotika a dvoch antimykotík na kmene rodu *Cryptococcus*. Na stanovenie je použité antibiotikum actidion a antimykotiká fluconazol a voriconazol.
 - Sledovanie rastu bez prítomnosti vitamínov.
 - Sledovanie rastu v prítomnosti alkoholov etanolu a glycerolu.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Zoznam použitých druhov kvasiniek ako štandardov pre biotypizáciu

Tabuľka 2: Použité štandardy kvasiniek.

	Identifikačné číslo	Názov
1	4/6	<i>Filobasidium oeirense</i>
2	4/4	<i>Filobasidium oeirense</i>
3	8/3	<i>Filobasidium magnum</i>
4	CCY 17-4-40	<i>Filobasidium magnum</i>
5	CCY 17-4-32	<i>Filobasidium wieringae</i>
6	4/13	<i>Filobasidium wieringae</i>
7	CCY 17-28-3	<i>Holtermanniella festucosa</i>
8	CCY 17-28-1	<i>Holtermanniella festucosa</i>
9	19/3	<i>Holtermanniella takashimae</i>
10	4/7	<i>Holtermanniella takashimae</i>
11	CCY 17-4-1	<i>Naganishia albida</i>
12	24/12	<i>Naganishia albidosimilis</i>
13	6/5-2	<i>Naganishia cerealis</i>
14	27/2	<i>Papiliotrema flavescens</i>
15	CCY 17-3-38	<i>Papiliotrema flavescens</i>
16	8/10	<i>Papiliotrema laurentii</i>
17	CCY 17-3-2	<i>Papiliotrema laurentii</i>
18	201	<i>Papiliotrema terrestris</i>
19	CCY 17-25-1	<i>Solicoccozyma aerea</i>
20	4/19	<i>Udeniomyces pyricola</i>
21	2/12	<i>Vishniacozyma victoriae</i>
22	14/16	<i>Vishniacozyma victoriae</i>

CCY – Culture Collection of Yeasts (CCY), Zbierka kultúr kvasiniek (CCY)

4.2 Zoznam použitých kvasiniek rodu *Cryptococcus* na identifikáciu

Tabuľka 3: Zoznam vzoriek na biotypizáciu.

	Číslo kmeňa	Miesto izolácie	Časť rastliny	Rastlina
1	42	Lúka, Lesopark Rusovce	Byľ	Zlatobyľ obrovská
2	II.48	Záhrada, hruška, Martin	Byľ	Veronika roľná
3	II.52	Lúka, Martin	List	Vratič obyčajný
4	28	Záhrada, stará jablň, Martin	Kvet	Iskerník prudký
5	22	Lúka, Lesopark Rusovce	List	Ďatelina lúčna
6	17	Záhrada, stará jablň, Martin	List	Prhľava dvojdómá
7	III.1	Lúka, Martin	Kvet	Šafran siaty
8	39	Záhrada, hruška, Martin	List	Iskerník prudký
9	51	Záhrada, hruška, Martin	List	Iskerník prudký
10	35	Lúka, Martin	List	Bodliak obyčajný

11	27	Lúka, Martin	Kvet	Iskerník prudký
12	1	Lúka, Martin	Byľ	Veronika roľná
13	II.62.2	Záhrada, jabloň, Martin	List	Čiernohlávk veľkokvetý
14	II.62.3	Záhrada, jabloň, Martin	List	Čiernohlávk veľkokvetý
15	II.39	Lúka, Martin	Byľ	Mäta pieporná
16	49	Lúka, Martin	Byľ	Pakost hnedočervený
17	113	Záhrada, jabloň, Martin	List	Veronika roľná
18	II.42	Záhrada, hruška, Martin	Byľ	Prasatnica jednoúborová
19	II.54	Lúka, Martin	Byľ	Bodliak obyčajný
20	56	Lúka, Lesopark Rusovce	Byľ	Púpava lekárska
21	II.36	Záhrada, stará jabloň, Martin	Kvet	Zádušník brečtanový
22	II.43	Lúka, Martin	List	Rebríček obyčajný
23	65	Lúka, jabloň, Martin	List	Mätonoh trvácny
24	44	Lúka, slivka, Martin	List	Iskerník prudký
25	30	Lúka, slivka, Martin	List	Ďatelina lúčna
26	II.55	Záhrada, stará jabloň, Martin	List	Bodliak obyčajný
27	57	Záhrada, jabloň, Martin	List	Púpava lekárska
28	52	Záhrada, stará jabloň, Martin	List	Zádušník brečtanový
29	2	Lúka, lesopark, Rusovce	Byľ	Ďatelina lúčna
30	II.41	Záhrada, stará jabloň, Martin	Kvet	Skoroceľ kopijovitý
31	II.57	Lúka, slivka, Martin	Byľ	Pyštek obyčajný
32	II.57.2	Lúka, Martin	Byľ	Pyštek obyčajný
33	23	Záhrada, jabloň, Martin	Celá rastlina	Iskerník prudký
34	II.51	Lúka, Martin	Byľ	Bodliak obyčajný
35	112	Záhrada, jabloň, Martin	List	Čiernohlávk veľkokvetý
36	112.2	Záhrada, jabloň, Martin	List	Čiernohlávk veľkokvetý
37	II.35	Záhrada, stará jabloň, Martin	List	Zádušník brečtanový
38	II.40	Lúka, Martin	List	Pakost hnedočervený
39	II.56	Lúka, jabloň, Martin	Byľ	Hrachor jarný
40	II.49	Lúka, Martin	List	Vratič obyčajný
41	110	Lúka, Martin	Kvet	Bodliak obyčajný
42	3	Záhrada, hruška, Martin	Byľ	Sedmikráska obyčajná
43	II.58	Lúka, Martin	Byľ	Pestrec mariánsky
44	II.60	Lúka, Martin	Kvet	Bodliak obyčajný
45	12	Záhrada, jabloň, Martin	Celá rastlina	Ďatelina lúčna
46	II.50	Lúka, Martin	List	Bodliak obyčajný
47	14	Lúka, Martin	Byľ	Ďatelina lúčna
48	38	Záhrada, jabloň, Martin	Kvet	Veronika roľná
49	II.47	Záhrada, hruška, Martin	Kvet	Veronika roľná
50	9	Záhrada, kopček, Martin	Byľ	Iskerník prudký
51	10	Záhrada, kopček, Martin	Kvet	Iskerník prudký
52	62	Záhrada, Rusovce	List	Lipnica lúčna
53	II.34	Záhrada, stará jabloň, Martin	List	Skoroceľ kopijovitý
54	II.37	Záhrada, stará jabloň, Martin	List	Skoroceľ kopijovitý
55	26	Záhrada, Rusovce	Kvet	Kostrava lúčna
56	55	Lúka, stred, Martin	List	Medúnok vlnatý
57	13	Lúka, Martin	List	Bodliak obyčajný
58	29	Lúka, slivka, Martin	Byľ	Veronika roľná
59	II.46	Lúka, Martin	Byľ	Farbovník obyčajný
60	II.46 2	Lúka, Martin	Byľ	Farbovník obyčajný
61	II.38	Lúka, Martin	Kvet	Mäta prieporná
62	32	Lúka stred, Martin	Byľ	Pýr plazivý
63	16	Záhrada, stará jabloň, Martin	Byľ	Prhľava dvojdómá

64	47	Záhrada, jabloň, Martin	Byľ	Púpava lekárska
65	59	Lúka stred, Martin	Kvet	Veronika roľná
66	48	Záhrada, jabloň, Martin	Kvet	Sedmikráska obyčajná
67	6	Lúka, jabloň, Martin	Byľ	Farbovník obyčajný
68	II.45	Lúka, pri ceste, Martin	List	Mäta prieporná
69	58	Lúka, jabloň, Martin	List	Iskerník prudký
70	15	Záhrada, jabloň, Martin	Byľ	Prhľava dvojdomá
71	64	Lúka, jabloň, Martin	Byľ	Veronika roľná
72	50	Záhrada, Rusovce	Byľ	Púpava lekárska
73	63	Lúka, jabloň, Martin	Byľ	Veronika roľná
74	II.44	Záhrada, stará jabloň, Martin	Byľ	Páperenec alpínsky
75	61	Záhrada, jabloň, Martin	List	Ďatelina lúčna
76	60	Záhrada, Rusovce	List	Žihľava dvojdomá
77	II.53	Lúka, Martin	Kvet	Pakost hnedočervený
78	III.2	Lúka, Martin	Kvet	Šafran zlatožltý
79	III.19	Záhrada, Martin	List	Pyštek obyčajný

4.3 Zoznam použitých prístrojov a chemikálií

4.3.1 Použité prístroje

- Analytické váhy WAA 160/C/2, Radwag (Poľsko)
- Centrifúga Mikro 200, Hettich Lab Technology (Nemecko)
- Centrifúga Mini Spin, Eppendorf AG (Nemecko)
- Fotoaparát Nikon D5100, Nikon Corporation (Japonsko)
- Hmotnostný spektrometer MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme s MTP 384 Target Plate Polished Steel TF (Target plate with transponder technology), Bruker Daltonik GmbH (Nemecko)
- Laminárny box MSC-Advantage™, Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)
- Vortex mixer Reax Top, Heindolph Instruments GmbH & Co. KG. (Nemecko)
- Vortex mixer ZX Classic, VELP Scientifica (Taliansko)

4.3.2 Použité chemikálie

- Acetonitril (LC-MS CHROMASOLV®, ≥ 99,9%), Fluka analytical, Sigma-Aldrich (Holandsko)
- Actidion, antibiotikum, Upjohn (USA)
- D-galaktóza čistá, Lachema N. P., Chemapol (Česká Republika)

- D-glukóza monohydrát p. a., Slavus (Slovenská Republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný čistý, Lachema N. P., Chemapol (Česká Republika)
- D-maltóza monohydrát čistá, Lachema N. P., Chemapol (Česká Republika)
- D(+)-rafinóza pentahydrát 99+%, Acros Organics (USA)
- Etanol 96,3% p. a., Slavus (Slovenská Republika)
- Fenolová červeně
- Fluconazol (FCA 25), antimykotikum, Oxoid (Veľká Británie)
- Heptahydrát síranu horečnatého, Lachema N. P., Chemapol (Česká Republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný p. a., Lachema N. P., Chemapol (Česká Republika)
- Inulín, Reanal (Maďarsko)
- Kvasničný extrakt, Merck (Nemecko)
- Kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová (CHCA, Matrix substance for Maldi-MS, \geq 99%, HPLC), Fluka analytical, Sigma Aldrich (Holandsko)
- Kyselina trifluoroctová (pre syntézu), Merck KGaA (Nemecko)
- Kyselina ferulová (trans-ferulic acid, FA, Matrix substance for MALDI-MS, \geq 99%, HPLC), Fluka analytical, Sigma Aldrich (Holandsko)
- Kyselina sinapová (SA, Matrix substance for MALDI-MS, \geq 99%, (T)), Fluka analytical, Sigma Aldrich (Holandsko)
- Kyselina mravčia (pre analýzu 98-100%), Merck, KGaA, Schuchardt (Nemecko)
- Laktóza p.a., Lachema N. P., Chemapol (Česká Republika)
- Melibióza, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Močovina p.a., Lachema N. P., Chemapol (Česká Republika)
- Peptón, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- ProteoMassTM Cytochrom c MALDI-MS Standard, Sigma-Aldrich (Holandsko)
- Sacharóza čistá, Lachema N. P., Chemapol (Česká Republika)

- Síran amónny, Slavus (Slovenská Republika)
- Sladina (Malt extract), Biolife (Taliansko)
- Trehalóza, Serva (Nemecko)
- Voriconazol (VOR 1), antimykotikum, Oxoid (Veľká Británia)

4.3.3 Použité softwarové programy

- FlexControl 3.1 (Ultraflex TOF/TOF), Bruker Daltonik GmbH (Nemecko)
- Maldi Biotyper 3.1 (Software for microorganism identification and classification), Bruker Daltonik GmbH (Nemecko)

4.4 Biotypizácia MALDI-TOF MS

4.4.1 Príprava kultivačných médií

Vybrané kultúry kvasiniek rodu *Cryptococcus* boli kultivované na dvoch typoch médií – na YPD (*Yeast pepton dextrose*) médiu a na sladínovom agare.

Príprava YPD média

Na prípravu 250 ml YPD média bolo navážených 5 g glukózy, 2,5 g kvasničného extraktu, 5 g peptónu a 5 g agaru. Uvedená zmes bola rozpustená v 250 ml vody a varená vo vodnom kúpeli. Médium bolo následne naliate do skúmaviek a sterilizované v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút. Sterilné YPD médium bolo ponechané v šikmej polohe do stuhnutia a uskladnené pri 4–6 °C.

Príprava sladínového agaru

Na prípravu 250 ml sladínového agaru bolo použitých 17,5 g sladiny, 0,5 g glukózy a 3,75 g agaru. Uvedené suroviny boli rozpustené v 250 ml destilovanej vody vo vodnom kúpeli. Pripravené médium bolo naliate do skúmaviek a následne sterilizované v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút. Sterilné médium bolo ponechané v šikmej polohe až do stuhnutia a následne uskladnené pri 4–6 °C.

4.4.2 Inokulácia a kultivácia kvasiniek

Jednotlivé vzorky kvasiniek boli postupne preočkované z pôvodného sladínového agaru do skúmaviek s YPD médiom a sladínovým agarom. Inokulácia prebehla vo vysterilizovanom laminárnom boxe pomocou sterilnej inokulačnej slučky. Preočkované kultúry kvasiniek boli kultivované po dobu 4 dní pri 22 °C.

4.4.3 Príprava použitých matric

Na biotyping boli použité 2 druhy matric – SA/FA matrica a CHCA matrica.

Príprava SA/FA matrice

Do rôznych 2 ml uzatvárateľných skúmaviek bolo navážených 10 mg FA (kyselina ferulová) a 30 mg SA (kyselina sinapová). Do 2 rôznych kadičiek bola pripravená zmes s 500 μ l acetonitrilu, 250 μ l 10% kyseliny trifluoroctovej a 250 μ l destilovanej vody. Obe navážené kyseliny boli následne rozpustené v pripravených roztokoch a zmiešané v pomere 1:1. Takto pripravená matrica bola uskladnená v chladničke.

Príprava CHCA matrice

10 mg kyseliny α -kyano-4-hydroxyškoricovej bolo rozpustených v zmesi zloženej z 500 μ l acetonitrilu, 250 μ l 10% kyseliny trifluoroctovej a 250 μ l destilovanej vody. Takto pripravená matrica bola uskladnená v chladničke.

4.4.4 Odber vzorky

Kultúry kvasiniek, ktoré boli 4 dni kultivované na YPD médiu a sladínovom agare, boli sterilne odoberané inokulačnou slučkou. Do skúmavky o objeme 2 ml bola odobratá slučka kvasinkovej kultúry. Bunky boli rozsuspendované v destilovanej vode, ktorej množstvo sa líšilo od typu použitej metódy prípravy vzorky. Pri Brukerovej metóde prípravy vzorky bola kvasinková kultúra rozsuspendovaná v 300 μ l destilovanej vody. Vzorky pripravované premývacou metódou s destilovanou vodou boli rozsuspendované v 1 ml destilovanej vody.

4.4.5 Metódy prípravy vzorky

Na prípravu analyzovaných vzoriek boli použité 2 metódy – Brukerova metóda a premývacia metóda s destilovanou vodou

Brukerova metóda prípravy vzorky

Kvasinková kultúra bola premiešaná pomocou vortex mixéru a následne k nej bolo pridaných 900 μ l etanolu. Vzorky boli centrifugované 10 minút pri 10 000 rpm. Po centrifugácii bol odobratý supernatant a vzorky boli centrifugované ešte raz pri rovnakých podmienkach. Zvyšný supernatant bol odoberaný pipetou. Následne bolo k vzorkám pridaných 100 μ l 70% kyseliny mravčej. Skúmavky so vzorkami boli premiešané pomocou vortex mixéru a následne k nim bolo pridaných 100 μ l 100% acetonitrilu. Takto pripravené vzorky boli nechané 30 minút pri laboratórnej teplote. Po uplynutí tejto doby boli bunky centrifugované 10 minút pri 10 000 rpm.

Premývacia metóda prípravy vzorky

Bunky rozsuspendované v 1 ml destilovanej vody boli centrifugované 10 minút pri 10 000 rpm. Následne bol zo vzoriek odobratý supernatant a k sedimentu bol pridaný 1 ml destilovanej vody. Vzorky boli premiešané pomocou vortex mixéru a centrifugované 10 minút pri 10 000 rpm. Tieto kroky boli zopakované sedemkrát. Po poslednom kroku bol zvyšný supernatant odoberaný pipetou a k sedimentu bolo pridaných 50 µl SA/FA matrice. Takto pripravené vzorky boli premiešané vortex mixérom a nechané po dobu 30 minút pri laboratórnej teplote. Následne boli vzorky znovu centrifugované 10 minút pri 10 000 rpm.

4.4.6 Nanášanie vzorky na MALDI platničku

Pri vzorkách pripravených Brukerovou metódou bol na platničku nanesený 1 µl supernatantu zo vzoriek, ktorý bol po zaschnutí prekrytý 1 µl CHCA matrice alebo SA/FA matrice. Vzorky pripravené premývacou metódou boli nanášané na MALDI platničku v podobe 1 µl supernatantu.

4.4.7 Analýza vyextrahovaných proteínov MALDI-TOF MS

Vyextrahované proteíny boli analyzované pomocou prístroja Bruker UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF a programu FlexControl. Meraniu, ktoré prebiehalo v lineárnom pozitívnom móde (LP MID), predchádzala kalibrácia zariadenia. Ako štandard bol použitý cytochróm c, ktorého 1 µl bol nanesený na MALDI platničku a prekrytý 1 µl SA/FA matrice. Po kalibrácii zariadenia bola zvolená frekvencia lasera 1 000 Hz a napätie urýchľovača 25 kV. Vzorky boli merané v rozsahu 2 000 – 22 000 Da a počet výstrelov na vzorku bol 1 000. Ak bola kvalita získaného spektra nevyhovujúca, intenzita lasera bola zmenená a meranie sa zopakovalo.

4.4.8 Spracovanie a vyhodnotenie dát

Získané spektrá boli spracované a vyhodnotené v programe MALDI Biotyper. Vždy bolo porovnávané spektrum štandardu so spektrom neznámej vzorky, pričom kritériami boli typ kultivačného média a metóda prípravy vzorky. Výsledkom porovnania bolo skóre zhody, ktoré nadobúdalo hodnoty od nula po tri, pričom ak bola hodnota skóre dva a viac, spektrá boli zhodné. Ak sa skóre zhody pohybovalo medzi hodnotou 1,999 až 1,700 spektrá boli pravdepodobne zhodné, pričom pre potvrdenie zhody boli potrebné ďalšie testy. Porovnávané spektrá neboli zhodné, ak sa skóre zhody pohybovalo medzi hodnotami pod 1,699. Z analyzovaných a normalizovaných spektier boli taktiež zostavené výsledné dendrogramy.

4.5 Mikrobiologické metódy stanovenia jednotlivých charakteristík

4.5.1 Zoznam testovaných kultúr kvasiniek

Tabuľka 4: Zoznam vzoriek podrobených mikrobiologickému stanoveniu.

	Číslo kmeňa	Miesto izolácie	Časť rastliny	Rastlina
1	42	Lúka, Lesopark Rusovce	Byľ	Zlatobyľ obrovská
2	II.48	Záhrada, hruška, Martin	Byľ	Veronika roľná
3	28	Záhrada, stará jabloň, Martin	Kvet	Iskerník prudký
4	22	Lúka, Lesopark Rusovce	List	Ďatelina lúčna
5	III.1	Lúka, Martin	Kvet	Šafran siaty
6	39	Záhrada, hruška, Martin	List	Iskerník prudký
7	51	Záhrada, hruška, Martin	List	Iskerník prudký
8	35	Lúka, Martin	List	Bodliak obyčajný
9	1	Lúka, Martin	Byľ	Veronika roľná
10	II.62.2	Záhrada, jabloň, Martin	List	Čiernohlávk veľkokvetý
11	II.62.3	Záhrada, jabloň, Martin	List	Čiernohlávk veľkokvetý
12	II.39	Lúka, Martin	Byľ	Mäta pieporná
13	49	Lúka, Martin	Byľ	Pakost hnedočervený
14	113	Záhrada, jabloň, Martin	List	Veronika roľná
15	II.42	Záhrada, hruška, Martin	Byľ	Prasatnica jednoúborová
16	II.54	Lúka, Martin	Byľ	Bodliak obyčajný
17	56	Lúka, Lesopark Rusovce	Byľ	Púpava lekárska
18	II.36	Záhrada, stará jabloň, Martin	Kvet	Zádušník brečtanový
19	II.43	Lúka, Martin	List	Rebriček obyčajný
20	65	Lúka, jabloň, Martin	List	Mätonoh trvácný
21	2	Lúka, lesopark, Rusovce	Byľ	Ďatelina lúčna
22	II.41	Záhrada, stará jabloň, Martin	Kvet	Skoroceľ kopijovitý
23	112	Záhrada, jabloň, Martin	List	Čiernohlávk veľkokvetý
24	112.2	Záhrada, jabloň, Martin	List	Čiernohlávk veľkokvetý
25	II.35	Záhrada, stará jabloň, Martin	List	Zádušník brečtanový
26	II.40	Lúka, Martin	List	Pakost hnedočervený
27	II.56	Lúka, jabloň, Martin	Byľ	Hrachor jarný
28	110	Lúka, Martin	Kvet	Bodliak obyčajný
29	3	Záhrada, hruška, Martin	Byľ	Sedmikráska obyčajná
30	II.60	Lúka, Martin	Kvet	Bodliak obyčajný
31	14	Lúka, Martin	Byľ	Ďatelina lúčna
32	38	Záhrada, jabloň, Martin	Kvet	Veronika roľná
33	9	Záhrada, kopček, Martin	Byľ	Iskerník prudký
34	10	Záhrada, kopček, Martin	Kvet	Iskerník prudký
35	II.34	Záhrada, stará jabloň, Martin	List	Skoroceľ kopijovitý
36	II.37	Záhrada, stará jabloň, Martin	List	Skoroceľ kopijovitý
37	26	Záhrada, Rusovce	Kvet	Kostrava lúčna
38	55	Lúka, stred, Martin	List	Medúnok vlnatý
39	II.46	Lúka, Martin	Byľ	Farbovník obyčajný
40	6	Lúka, jabloň, Martin	Byľ	Farbovník obyčajný
41	50	Záhrada, Rusovce	Byľ	Púpava lekárska
42	II.53	Lúka, Martin	Kvet	Pakost hnedočervený
43	III.2	Lúka, Martin	Kvet	Šafran zlatožltý
44	III.19	Záhrada, Martin	List	Pyštek obyčajný

4.5.2 Stanovenie konštanty radiálneho rastu

Príprava média

Na stanovenie konštanty radiálneho rastu bolo použité tuhé médium sladínového agaru. Na jeho prípravu bolo v 250 ml vody rozpustených 17,5 g sladiny, 3,75 g agaru a 0,5 g glukózy. Hotové médium bolo sterilizované v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút. Po vychladnutí bolo médium sterilne rozlievané do Petriho misiek a uskladnené pri teplote 7 °C.

Inokulácia a kultivácia kvasiniek

Kultúra kvasiniek bola sterilne odoberaná zo šikmého sladínového agaru do skúmaviek so sterilnou vodou tak, aby bol na hladine jemný zákal. Následne bolo množstvo kultúry vo vode odpipetované a umiestnené na sladínový agar vo forme jednej kvapky. Po zaschnutí kvapiek boli kvasinky kultivované po dobu 15 dní pri teplote 22 °C. Ich rast bol pravidelne sledovaný, pričom sa zaznamenával priemer kvapky kvasinkovej kultúry a vonkajší vzhľad.

4.5.3 Stanovenie prítomnosti ureázy

Príprava média

Na prípravu média boli použité nasledujúce suroviny:

- 10 g močoviny
- 4,6 g KH_2PO_4
- 4,8 g Na_2HPO_4
- 0,5 g kvasničného extraktu
- 0,005 g fenolovej červene
- 500 ml vody

Jednotlivé navážky boli rozpustené v 500 ml vody. Následne bolo pripravené médium podrobené sterilizácii filtráciou.

Inokulácia kvasiniek a sledovanie priebehu stanovenia

Kultúra kvasiniek bola sterilne odoberaná zo šikmého sladínového agaru do skúmaviek s pripraveným médiom a uskladnená pri teplote 28 °C. Sfarbenie z pôvodnej oranžovej/žltej farby na ružovú bolo pozorované po dobu 12 dní.

4.5.4 Stanovenie asimilácie a fermentácie cukrov

Príprava sacharidových médií na fermentáciu

Na stanovenie fermentácie sacharidov bolo použitých 6 druhov médií: médium s obsahom galaktózy, médium s obsahom glukózy, médium s obsahom laktózy, médium s obsahom maltózy, médium s obsahom rafinózy a médium s obsahom sacharózy.

Na prípravu média so sacharidom bolo v 500 ml vody rozpustených 10 g daného sacharidu a 0,5 g kvasničného extraktu. Pripravené médium bolo naliate do skúmaviek, do ktorých bola zároveň vložená Durhamova skúmavka. Pri tomto kroku bolo dôležité, aby daná skúmavka neobsahovala žiadne bubliny a bola úplne ponorená do média. Nasledovala sterilizácia v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút.

Príprava sacharidových médií na asimiláciu

Na stanovenie asimilácie cukrov bolo použitých 8 druhov médií: médium s obsahom galaktózy, médium s obsahom inulínu, médium s obsahom laktózy, médium s obsahom maltózy, médium s obsahom melibiózy, médium s obsahom rafinózy, médium s obsahom sacharózy a médium s obsahom trehalózy.

Na prípravu 1000 ml C-média boli použité nasledujúce suroviny:

- 10g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 1g KH_2PO_4
- 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 3g kvasničného extraktu
- 15g agar

Do média s C-agarom bolo pridaných 0,2 g sacharidu. Vytvorený roztok o koncentrácii 10% sa sterilizoval v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút.

Inokulácia kvasiniek a sledovanie priebehu fermentácie cukrov

Kultúra kvasiniek bola sterilne odoberaná zo šikmého sladínového agaru do skúmaviek s pripravenými sacharidovými médiami. Kultúry boli následne uskladnené pri 22 °C. Priebeh fermentácie cukrov kultúrami kvasiniek bol sledovaný počas 15 dní. Hlavným sledovaným parametrom bola tvorba kysličníka uhličitého v Durhamovej skúmavke.

Inokulácia kvasiniek a sledovanie priebehu asimilácie cukrov

Kultúra kvasiniek bola sterilne odoberaná zo šikmého sladínového agaru do skúmaviek s destilovanou vodou, kde bola kultúra rozsuspendovaná. Následne bola kultúra očkovaná do Petriho misiek s pripraveným C-médiom obsahujúcim daný sacharid. Asimilácia bola sledovaná po dobu 5 dní pri 22 °C. Pozitívny test sa prejavil nárastom kultúry kvasiniek.

4.5.5 Stanovenie citlivosti na antimykotiká

Príprava média

Na stanovenie bolo použité sterilné sladínové médium s agarom, ktoré bolo roztopené vo vodnom kúpeli.

Príprava actidionových diskov

Pred samotným stanovením boli pripravené disky so štyrmi rôznymi koncentraciami actidionu. Disky boli strihané z filtračného papiera. Následne boli pripravené štyri roztoky actidionu s koncentraciami 10 mg/ml, 2 mg/ml, 0,2 mg/ml a 0,02 mg/ml.

Roztok č. 1 s koncentraciou 10 mg/ml bol pripravený rozpustením 10 mg actidionu v 1 ml destilovanej vody. Roztok č. 2 s koncentraciou 2 mg/ml bol pripravený zmiešaním 0,2 ml roztoku č. 1 s 0,8 ml destilovanej vody. Roztok č. 3 s koncentraciou 0,2 mg/ml bol pripravený zmiešaním 0,1 ml roztoku č. 2 s 0,9 ml destilovanej vody a roztok č. 4 s koncentraciou 0,02 mg/ml bol pripravený zmiešaním 0,1 ml roztoku č. 3 s 0,9 ml destilovanej vody.

Každý disk bol následne označený číslami 1,2,3 a 4 vyjadrujúcimi koncentráciu actidionu. Na každý disk bolo pridaných 5 µl roztoku actidionu a takto pripravené disky boli podrobené suchej sterilizácii 2 hodiny pri teplote 164 °C.

Inokulácia kvasiniek

Kvasinková kultúra bola sterilne odoberaná zo šikmého sladínového agaru do skúmaviek, ktoré obsahovali 300 µl sterilnej vody. V skúmavkách bola kultúra rozsuspendovaná tak, aby bol na hladine jemný zákal. Roztopené médium bolo sterilne rozlievané do Petriho misiek. Po tom, čo médium v miskách mierne vychladlo, bolo k nemu pridaných 100 µl suspenzie kultúry kvasiniek. Médium s kvasinkovou kultúrou bolo jemne zamiešané a takto pripravené Petriho misky boli ponechané v laminárnom boxe, až kým médium úplne nestuhlo. Po stuhnutí boli na agar pridávané disky obsahujúce 4 rôzne koncentrácie antibiotika actidion, ktoré boli vopred pripravené. Ako ďalšie boli na agar umiestnené komerčne dostupné disky s definovaným obsahom antimykotík - disk s 25 µg antimykotika fluconazol a disk s 1 µg antimykotika voriconazol. Pripravené Petriho misky s kultúrou kvasiniek boli kultivované pri teplote 22 °C

a ich rast bol sledovaný po dobu 10 dní. Meraným parametrom bola veľkosť inhibičných zón okolo jednotlivých diskov antimykotík a antibiotika.

4.5.6 Rast bez prítomnosti vitamínov

Príprava minimálneho média

Na prípravu média boli použité nasledujúce suroviny:

- 20 g glukózy
- 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 1 g K_2HPO_4
- 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 000 ml destilovanej vody

Jednotlivé navážky boli rozpustené v 1 000 ml vody. Následne bolo pripravené médium sterilizované v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút.

Inokulácia kvasiniek a sledovanie priebehu stanovenia

Kultúra kvasiniek bola sterilne odoberaná zo šikmého sladínového agaru do skúmaviek s minimálnym médiom. V médiu bola kultúra kvasiniek rozsuspendovaná a uskladnená pri teplote 22 °C po dobu 1 týždňa. Po týždni bola kultúra preočkovaná do druhej skúmavky s minimálnym médiom a kultivovaná po dobu 2 týždňov pri teplote 22 °C. Sledovaná bola tvorba zákalu v skúmavke.

4.5.7 Sledovanie rastu v prítomnosti alkoholov

Príprava média

Na prípravu média na alkoholy boli použité nasledujúce suroviny:

- 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 1 g K_2HPO_4
- 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 000 ml destilovanej vody

Jednotlivé navážky boli rozpustené v 1 000 ml destilovanej vody. Následne bolo pripravené médium sterilizované v autokláve pri 121 °C po dobu 20 minút. Po vychladnutí bolo

do skúmaviek nalievajúcich 10 ml pripraveného média. K médiu bolo ďalej sterilne pridaných 200 µl etanolu alebo glycerolu.

Inokulácia kvasiniek

Po sterilnom odobratí kvasinkovej kultúry zo šikmého sladínového agaru, bola táto kultúra rozsuspendovaná v pripravenom médiu obsahujúcom daný alkohol. Následne bolo sledované vytvorenie zákalu v skúmavke po dobu 14 dní.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Biotypizácia MALDI-TOF MS

Identifikácia vzoriek kvasiniek rodu *Cryptococcus* bola prevedená na základe porovnania spektra štandardu so spektrom vzorky kvasinky. Z celkového počtu 79 vzoriek bolo na základe skóre zhody identifikovaných 51 vzoriek kvasiniek so štandardami, ktoré patrili k druhu *Filobasidium magnum* (6), *Filobasidium oeirense* (3) a *Filobasidium wieringae* (42). Nejednoznačnú identifikáciu vykazovali 4 vzorky a 24 vzoriek nebolo možné pomocou tejto metódy identifikovať, pretože neboli zhodné ani s jedným z porovnávaných štandardov. Kompletné výsledky MALDI-TOF MS sú zhrnuté v Tabuľke 5.

Tabuľka 5: Výsledky biotypizácie.

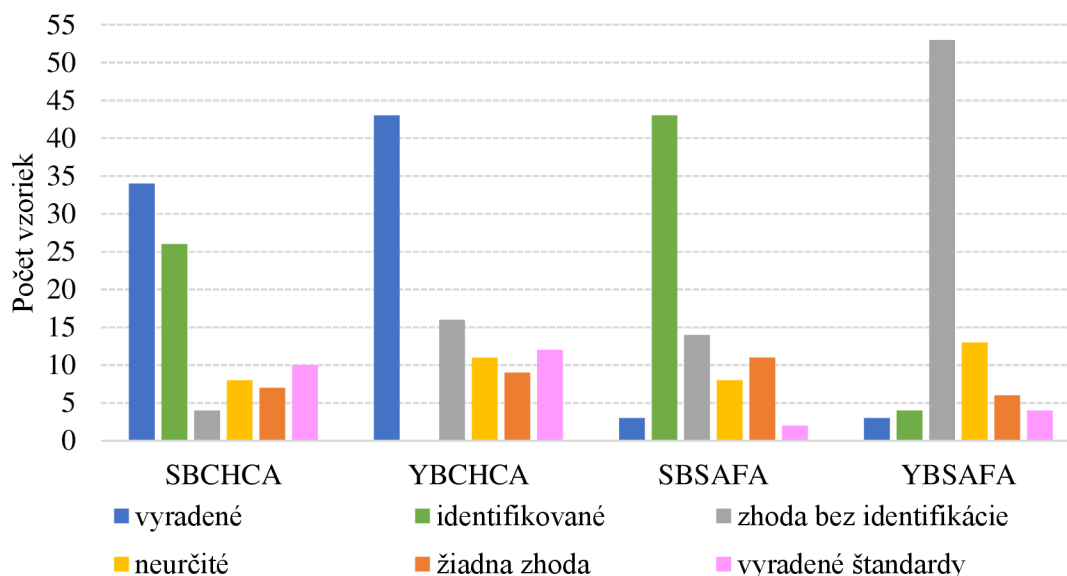
	číslo kmeňa	Podobnosť
1	42	Ani s jedným zo štandardov
2	II.48	Pravdepodobne zhodné s <i>F. wieringae</i>
3	II.52	<i>Filobasidium wieringae</i>
4	28	Ani s jedným zo štandardov
5	22	Pravdepodobne zhodné s <i>F. magnum</i>
6	17	<i>Filobasidium wieringae</i>
7	III.1	Ani s jedným zo štandardov
8	39	Zhodné s 51
9	51	Zhodné s 39
10	35	<i>Filobasidium wieringae</i>
11	27	<i>Filobasidium wieringae</i>
12	1	Ani s jedným zo štandardov
13	II.62.2	Nie je z rodu <i>Cryptococcus</i>
14	II.62.3	Nie je z rodu <i>Cryptococcus</i>
15	II.39	Ani s jedným zo štandardov
16	49	Ani s jedným zo štandardov
17	113	Ani s jedným zo štandardov
18	II.42	Ani s jedným zo štandardov
19	II.54	Pravdepodobne zhodné s <i>F. oeirense/magnum</i>
20	56	<i>Filobasidium wieringae</i>
21	II.36	Ani s jedným zo štandardov
22	II.43	<i>Filobasidium wieringae</i>
23	65	<i>Filobasidium wieringae</i>
24	44	<i>Filobasidium wieringae</i>
25	30	<i>Filobasidium wieringae</i>
26	II.55	<i>Filobasidium wieringae</i>
27	57	<i>Filobasidium wieringae</i>
28	52	<i>Filobasidium wieringae</i>
29	2	Ani s jedným zo štandardov

30	II.41	Ani s jedným zo štandardov
31	II.57	<i>Filobasidium wieringae</i>
32	II.57.2	<i>Filobasidium wieringae</i>
33	23	<i>Filobasidium wieringae</i>
34	II.51	<i>Filobasidium wieringae</i>
35	112	Ani s jedným zo štandardov
36	112.2	Ani s jedným zo štandardov, zhodné s 38
37	II.35	Ani s jedným zo štandardov
38	II.40	<i>Filobasidium magnum</i>
39	II.56	<i>Filobasidium wieringae</i>
40	II.49	<i>Filobasidium wieringae</i>
41	110	<i>Filobasidium magnum</i>
42	3	<i>Filobasidium magnum</i>
43	II.58	<i>Filobasidium wieringae</i>
44	II.60	Pravdepodobne zhodné <i>F. wieringae</i>
45	12	<i>Filobasidium wieringae</i>
46	II.50	<i>Filobasidium wieringae</i>
47	14	<i>Filobasidium magnum</i>
48	38	Ani s jedným zo štandardov, zhodné s 112.2
49	II.47	<i>Filobasidium wieringae</i>
50	9	<i>Filobasidium oeirense</i>
51	10	<i>Filobasidium oeirense</i>
52	62	<i>Filobasidium wieringae</i>
53	II.34	Ani s jedným zo štandardov, zhodné s II.37
54	II.37	Ani s jedným zo štandardov, zhodné s II.34
55	26	<i>Filobasidium magnum</i>
56	55	Ani s jedným zo štandardov
57	13	<i>Filobasidium oeirense</i>
58	29	<i>Filobasidium wieringae</i>
59	II.46	<i>Filobasidium wieringae</i>
60	II.46 2	<i>Filobasidium wieringae</i>
61	II.38	<i>Filobasidium wieringae</i>
62	32	<i>Filobasidium wieringae</i>
63	16	<i>Filobasidium wieringae</i>
64	47	<i>Filobasidium wieringae</i>
65	59	<i>Filobasidium wieringae</i>
66	48	<i>Filobasidium wieringae</i>
67	6	<i>Filobasidium wieringae</i>
68	II.45	<i>Filobasidium wieringae</i>
69	58	<i>Filobasidium wieringae</i>
70	15	<i>Filobasidium wieringae</i>
71	64	<i>Filobasidium wieringae</i>
72	50	<i>Filobasidium wieringae</i>
73	63	<i>Filobasidium wieringae</i>
74	II.44	<i>Filobasidium wieringae</i>

75	61	<i>Filobasidium wieringae</i>
76	60	<i>Filobasidium wieringae</i>
77	II.53	<i>Filobasidium magnum</i>
78	III.2	Ani s jedným zo štandardov
79	III.19	Ani s jedným zo štandardov

5.1.1 Vplyv kultivačného média

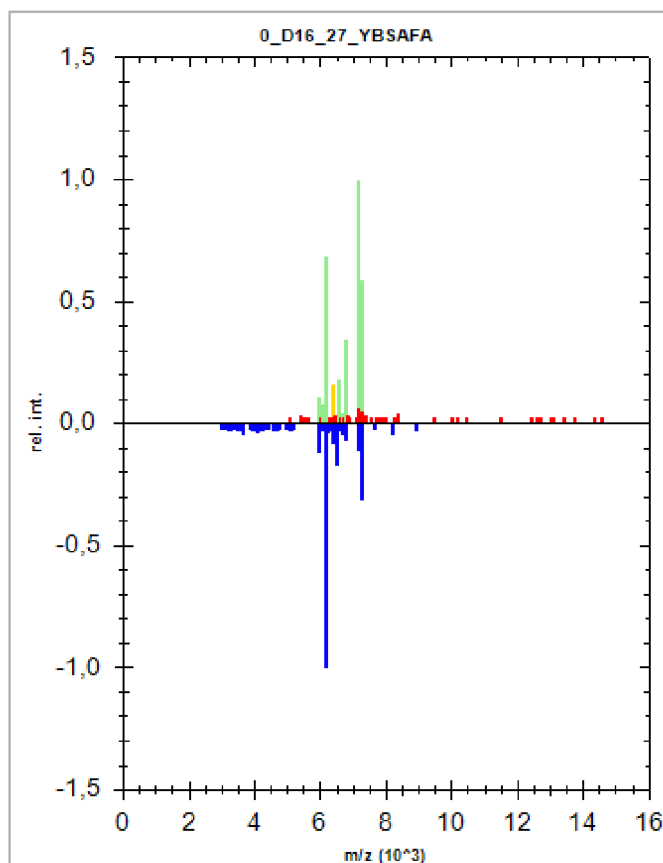
Vplyv kultivačného média na výsledky identifikácie bol sledovaný na sladínovom agare a YPD médiu. V Zbierke kultúr kvasiniek sa sladínový agar používa ako štandardné médium na kultiváciu kvasiniek. YPD médium je na rozdiel od sladínového agaru komplexnejšie médium, ktoré zabezpečuje lepšie podmienky pre rast buniek vďaka nutrične bohatšiemu zloženiu. Rozdiel použitia týchto dvoch médií na kultiváciu sledovaných kmeňov bol viditeľný aj pri výsledkoch stanovení (Obrázok 11).



Obrázok 11: Vplyv kultivačného média na výsledky biotypizácie MALDI-TOF MS pripravované pomocou Brukerovej metódy.

Rast kultúr rastúcich na YPD médiu bol intenzívnejší. Avšak pri identifikácii mali vzorky kvasiniek narastené na sladínovom agare lepšie spektrá pre analýzu. Kvasinky rastúce na YPD médiu vykazovali neurčitú zhodu so spektrami použitých štandardov, čo značí nedostatočnú kvalitu jednotlivých spektier. Pri kultivácii bol pozorovaný rozdielny nárast na médiách, kým na sladínovom agare boli menej tečúce, kým na YPD médiu mali kmene veľmi tečúcu formu a boli viac narastené, čo mohlo mať vplyv aj na tvorbu kapsuly, ktorá v stacionárnej fáze rastu kmeňa hrubne [88]. Kapsula taktiež mení svoju hrúbku podľa zloženia média. YPD médium obsahuje peptón, pri ktorom má kapsula druhu *F. magnum* hrúbku až 3,6 μm , pričom

pri glukóze má hrúbku 2,5 μm [89]. Glukózu obsahuje tak sladínový agar, ako aj YPD médium. Najvyšší podiel identifikovaných vzoriek dosiahlo použitie sladínového agaru v kombinácii s Brukerovou metódou a použitím SAFA matrice. Vzorka II.49 bola jedinou, ktorú sa podarilo identifikovať touto metódou na oboch typoch médií (SBSAFA vzorky kultivované na sladínovom agare a pripravované pomocou Brukerovej metódy, YBSAFA = vzorky kultivované na YPD médiu a pripravované pomocou Brukerovej metódy). Pri metóde SBSAFA bolo skóre zhody vzorky II.49 so štandardom 4/13 2,353. Vzorky kultivované na YPD médiu dosiahli metódou YBSAFA skóre zhody 2,043 oproti rovnakému štandardu. Úspešnosť SBSAFA pri identifikácii potvrdzujú aj ďalšie výsledky. Vzorka 27, pripravovaná metódou SBSAFA, mala skóre zhody s vyššie spomenutým štandardom 2,273. Naproti tomu rovnaká vzorka, pripravovaná metódou YBSAFA, mala skóre zhody pri rovnakom porovnaní 1,741 (Obrázok 12).



Obrázok 12: Porovnanie spektra vzorky 27 (zelená a žltá, hore) proti spektru štandardu 4/13 (modrá dole).

Rozdiel medzi týmito dvoma skóre zhody je 0,532, čo je najvyšší rozdiel spomedzi všetkých spektier a na obrázku 12 vidno, že sa vyskytla aj žltá a nie veľmi určitá zhoda v skóre. Ďalšie príklady rozdielov medzi jednotlivými skóre zhody sú uvedené v Tabuľke 6.

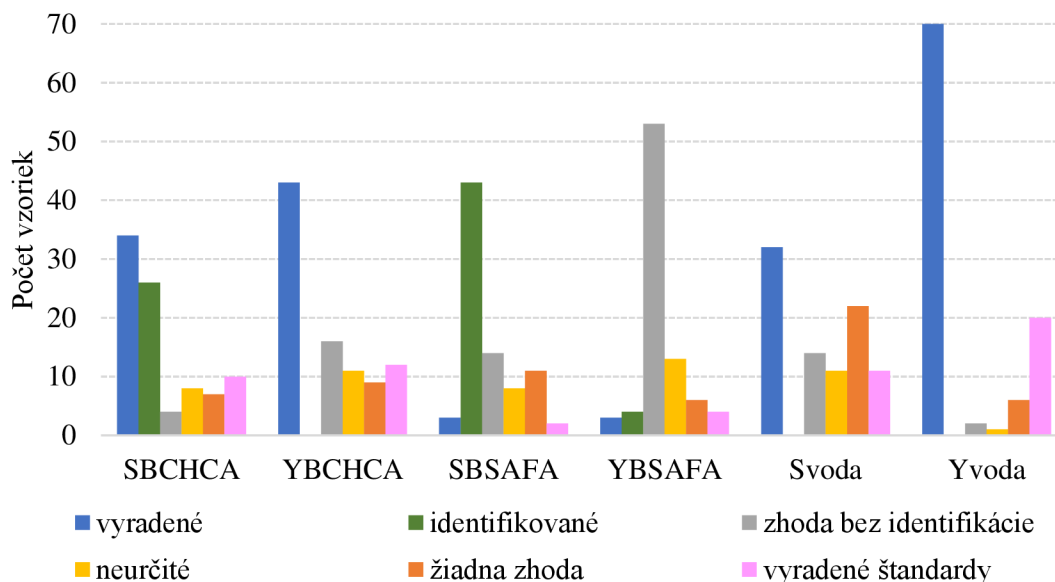
Tabuľka 6: Rozdiel vo vybraných skóre zhody jednotlivých spektier.

Štandard	Vzorka	SBSAFA	YBSAFA	Rozdiel
4/13	23	2,321	1,792	0,529
	27	2,273	1,741	0,532
	35	1,826	1,794	0,032
	II.55	2,093	1,758	0,335
17-28-1	49	1,994	1,839	0,155

Pozn.: zelená farba – zhoda, žltá farba – neurčitá zhoda

5.1.2 Vplyv metódy prípravy vzorky

Pre sledovanie vplyvu metódy prípravy vzorky na výsledky identifikácie boli vybrané 3 typy metód – premývacia metóda, Brukerova metóda s použitím SAFA matrice a Brukerova metóda s použitím CHCA matrice. Premývaciu metódu použil vo svojej diplomovej práci Jakub Jäger, ktorý ju zvolil za najvhodnejší postup spracovania vzoriek kvasiniek rodu *Cryptococcus* [90]. Vo svojej práci zvolil ako vhodné kultivačné médium pre túto metódu spracovania sladínový agar. V našej práci boli vzorky kultivované na sladínovom agare, ako aj YPD médiu. Pri porovnaní oboch metód sú značné rozdiely. Kmene kvasiniek narastených na YPD médiu, na ktoré bola použitá premývacia metóda (YVoda) mali najvyšší podiel nevyhovujúcich spektier, ktoré nemohli byť použité pri identifikácii (Obrázok 13).



Obrázok 13: Vplyv metód prípravy vzorky na výsledky biotypizácie MALDI-TOF MS.

Rovnako to bolo aj v prípade spektier štandardov. Z celkového počtu 79 spektier jednotlivých vzoriek bolo 70 nevyhovujúcich (Obrázok 13). Vyhovujúce spektrá dosiahli z celkového počtu 22 štandardov len 2 štandardy. Z tohto dôvodu nebolo možné identifikovať zvyšných 9 vzoriek. Premývacou metódou s použitím sladínového agaru na kultiváciu boli

dosiahnuté lepšie výsledky ako v prípade YPD média, no rovnako sa nepodarilo identifikovať žiadnu z vybraných vzoriek. Metóda sa javila vhodná pre identifikáciu kvasiniek rodu *Cryptococcus* hlavne kvôli tomu, že mukopolysacharidová kapsula obsahuje z väčšej časti vodu [88]. K rozrušeniu buniek využíva sedemnásobné premytie destilovanou vodou. Intracelulárne proteíny sú z buniek extrahované pomocou SAFA matrice. Vzhľadom na získané výsledky je možné zhodnotiť túto prípravu vzorky v našom prípade ako nie vhodnú pre potreby identifikácie kvasiniek rodu *Cryptococcus* pomocou MALDI-TOF MS (Obrázok 13). Spektrá vzoriek, pripravovaných premývacou metódou, neboli dostatočne kvalitné, čo môže byť spôsobené nedostatočným rozpustením kapsuly prítomnej okolo buniek. To môže mať za následok neúspešnú extrakciu intracelulárnych proteínov potrebných k identifikácii. Tento fakt potvrdzuje aj prítomnosť veľkého množstva šumu v spektre. Pre overenie tejto hypotézy by bolo potrebné mikroskopické pozorovanie vzoriek obsahujúcich vyextrahované proteíny, napríklad prostredníctvom AFM mikroskopu (mikroskopia atomárnych síl, z ang. Atomic Force Microscopy).

Brukerova metóda s použitím CHCA matrice je metóda vyvinutá firmou Bruker Daltonik GmbH. Táto metóda sa líši od premývacej metódy v niekoľkých bodoch. Brukerova metóda využíva k rozrušeniu buniek etanol a kyselinu mravčiu. Proteíny sú následne z buniek extrahované pomocou acetonitrilu. Štandardizovaná metóda využíva ako maticu CHCA, ktorá je schopná identifikácie intaktných proteínov do molekulovej hmotnosti 12 kDa. Táto metóda v kombinácii s využitím sladínového agaru ako kultivačného média poskytla identifikáciu 26 vzoriek kvasiniek. Avšak 34 spektier vzoriek nebolo možné použiť k identifikácii, rovnako, ako 10 spektier štandardov. Vyššiu úspešnosť identifikácie mala Brukerova metóda s využitím SAFA matrice, ktorá je schopná ionizácie vyšších molekulárnych hmotností proteínov [85]. Pomocou tejto metódy a použitia sladínového agaru ako kultivačného média, sa podarilo identifikovať 43 vzoriek. Táto metóda poskytovala kvalitnejšie spektrá – nepostačujúce boli 3 spektrá vzoriek a 2 spektrá použitých štandardov. Navyše táto metóda potvrdila identifikáciu všetkých vzoriek, ktoré boli identifikované pomocou metódy SBCHCA. Prostredníctvom metódy YBSAFA boli identifikované 4 spektrá vzoriek, pričom 3 z nich sa nepodarilo identifikovať žiadnou inou metódou. Porovnanie jednotlivých metód je zobrazené na Obrázku 13. V prípade Brukerovej metódy bolo použitie etanolu a kyseliny mravčej dostatočné k rozpusteniu kapsuly chrániacej bunku, ako aj k rozrušeniu bunkovej membrány. Úspešnú extrakciu proteínov potrebných k identifikácii potvrdzujú získané výsledky. Preto považujeme za vhodný postup identifikácie kvasiniek rodu *Cryptococcus* použitie Brukerovej

metódy prípravy vzorky v kombinácii s využitím sladínového agaru ako kultivačného média. Pre kvasinky z kmeňa *Filobasidium oeirense* je vhodnejšie použitie YPD média na kultiváciu.

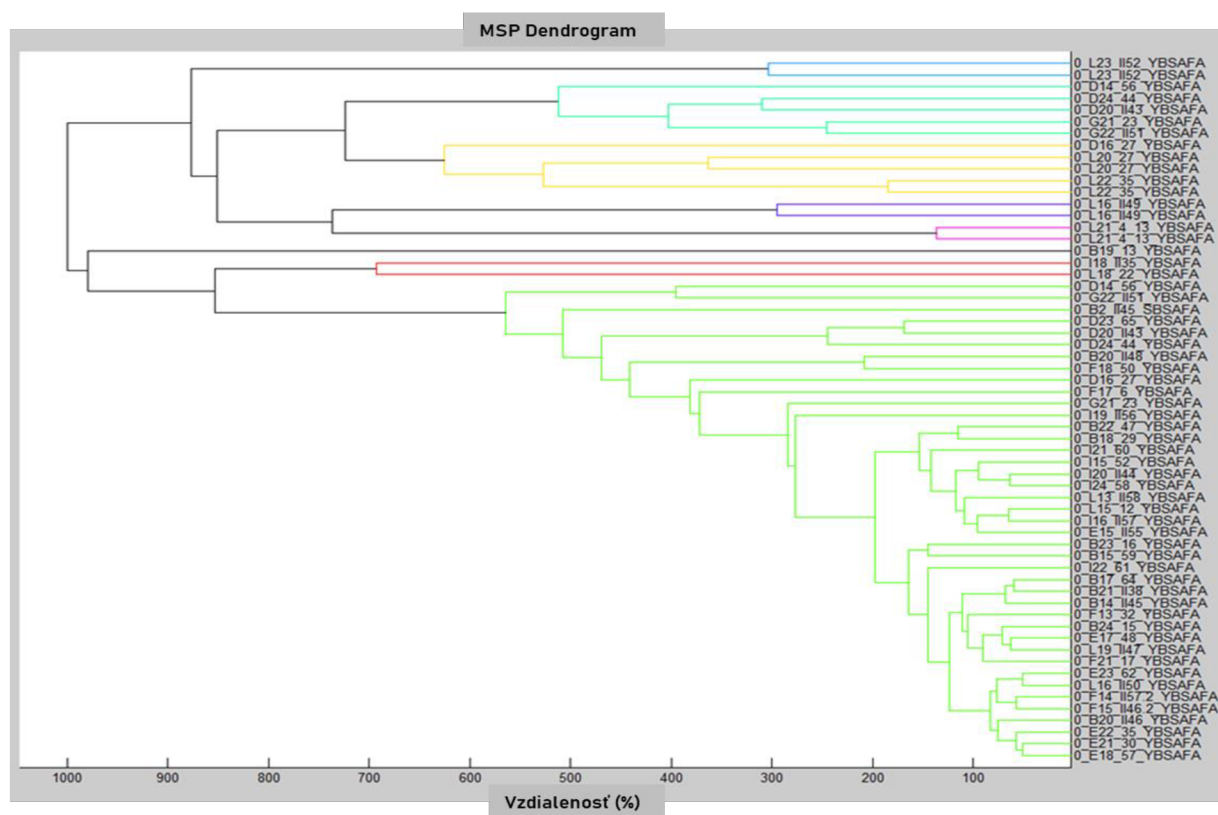
5.1.3 Taxonomické zaradenie

Pomocou metódy MALDI-TOF sa podarilo identifikovať 3 druhy kvasiniek, *Filobasidium magnum*, *Filobasidium oeirense* a *Filobasidium wieringae*, ktoré majú potvrdenú prítomnosť kapsuly [5]. *Filobasidium magnum* patrí medzi nepatogénne druhy a primárne sa nachádza na kvetoch rastlín, no sú známe prípady výskytu na listoch alebo plodoch [5]. Pri stanovení boli použité 2 štandardy *Filobasidium magnum*: štandard číslo 8/3 a štandard číslo 17-4-40. Pozitívnu zhodu so štandardom číslo 17-4-40 vykazovala vzorka II.40 so skóre zhody 2,045 pomocou metódy SBSAFA. Neurčitú zhodu s rovnakým štandardom vykazovali vzorky II.48 a 22, ktoré boli taktiež pripravované metódou SBSAFA. Pre vzorku II.48 bolo skóre zhody so štandardom 1,707 a pre vzorku 22 1,7. Štandard 8/3 vykazoval zhodu len použitím metódy YBSAFA. Zhoda so štandardom bola neurčitá – vzorka II.53 vykazovala skóre zhody 1,778 a vzorka II.54 1,888. Napriek tomu, že zhodu so štandardom vykazovala len jedna vzorka, podarilo sa na základe vzájomného porovnania spektier vzoriek identifikovať aj zvyšných 5 vzoriek. Tieto vzorky vykazovali v metóde YBSAFA zhodu medzi sebou navzájom.

Druh *Filobasidium oeirense* bol pri identifikácii zastúpený štandardami 4/4 a 4/6. S uvedenými štandardami vykazovali zhodu vzorky 9, 10 a 13. Všetky tri identifikované vzorky boli pripravované metódou YBSAFA, ktorá ako jediná poskytla spektrá s dostatočnou kvalitou potrebnou k identifikácii. Z tohto dôvodu hodnotíme YPD médium ako vhodnejšie pre potreby kultivácie. Pre dva zvyšné druhy kvasiniek odporúčame použiť na kultiváciu sladínový agar. Vzorka 13, pripravovaná metódou YBCHCA, mala skóre zhody so štandardom 4/4 1,854 a so štandardom 4/6 dosiahla skóre zhody 1,903. Metódou YBSAFA sa ju podarilo identifikovať iba proti štandardu 4/4, s ktorým dosiahla skóre zhody 2,006. Vzorky 9 a 10 dosiahli úspešné identifikácie proti obom nasadeným štandardom. Avšak obe vzorky dosiahli vyššie skóre zhody so štandardom 4/4.

Druh *Filobasidium wieringae* je pôvodne známy ako *Cryptococcus wieringae* a rovnako, ako ďalšie druhy *Filobasidiales*, je asociovaný s rastlinami [5]. Pod tento druh patril najvyšší podiel identifikovaných vzoriek. Úspešne sa podarilo identifikovať porovnaním so štandardami 42 testovaných vzoriek. Všetky vzorky boli identifikované prostredníctvom metódy SBSAFA. Z identifikovaných vzoriek sa taktiež 26 podarilo identifikovať prostredníctvom metódy SBCHCA. Druh *F. wieringae* reprezentovali pri identifikácii štandardy 4/13 a 17-4-32.

Štandard 4/13 dosiahol pri porovnávaní spektier vyššiu úspešnosť, pričom zhodu s jeho spektrom preukázalo 12 vzoriek. Najvyššie skóre zhody s uvedeným štandardom dosiahla vzorka II.49, ktorá pri porovnaní dosiahla skóre zhody 2,353. So štandardom 17-4-32 mali zhodné spektrá 3 vzorky. Zvyšných 27 vzoriek sa podarilo identifikovať vzájomným porovnaním jednotlivých spektier vzoriek. Na Obrázku 14 je ukážka dendrogramu z výsledných spektier získaných pomocou MALDI-TOF MS pre kmene narastené na YPD médiu a spracovaných SBSAFA metódou oproti štandardu 4/13 (*Filobasidium wieringae*). V dendrograme je vidieť rozdelenie vzoriek do jednotlivých skupín, podskupín a osamotených jedincov ako napríklad vzorka 13.



Obrázok 14: Dendrogram z výsledných spektier kmeňov narastených na YPD médiu a spracovaných Brukerovou SAFA metódou oproti štandardu 4/13 (*Filobasidium wieringae*).

5.2 Mikrobiologické stanovenie jednotlivých charakteristík kvasiniek

5.2.1 Stanovenie konštanty radiálneho rastu

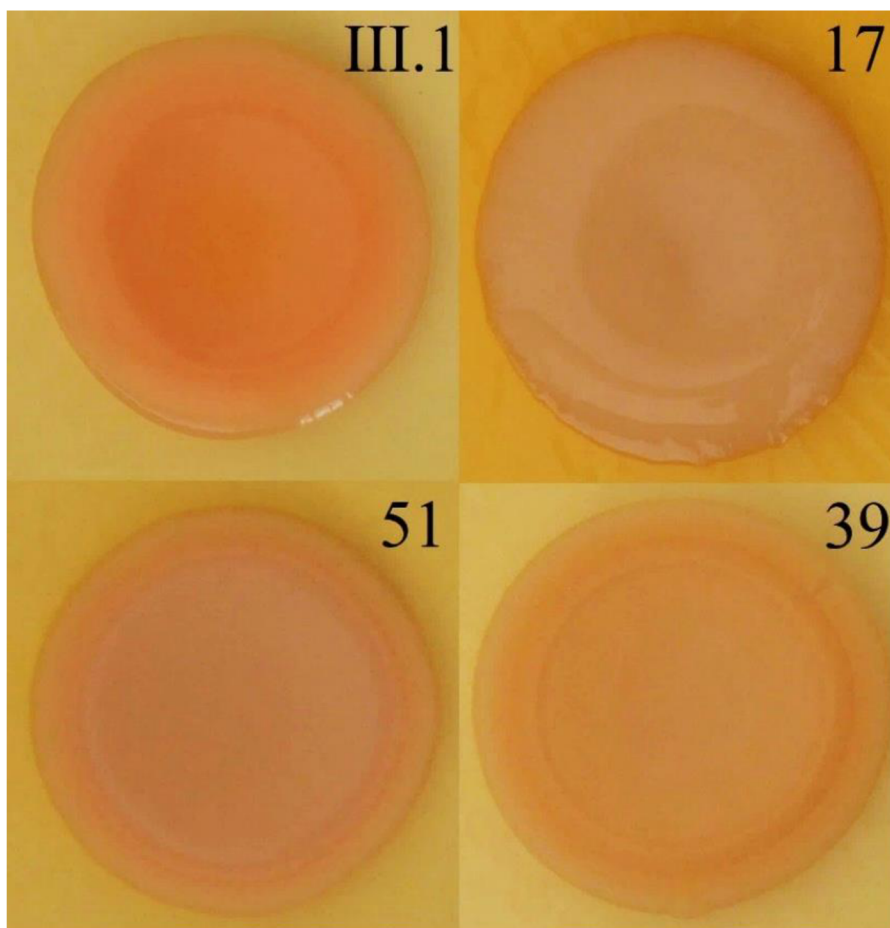
Konštanta radiálneho rastu bola vypočítaná na základe priemeru kvapky kultúry kvasinkovej suspenzie na začiatku a konci stanovenia. Všetky kultúry boli kultivované na sladínovom agare a rast bol sledovaný po dobu 21 dní. Kultivácia prebehla za prítomnosti kyslíka a pri teplote

22 °C. Získané výsledky pre jednotlivé vzorky a v rámci jedného druhu boli tak rozdielne, že pomocou tohto stanovenia nebolo možné určiť podobnosť medzi jednotlivými vzorkami. V nasledujúcej tabuľke je uvedené porovnanie konštánt radiálneho rastu vybraných vzoriek kvasiniek spolu s ich identifikáciou pomocou metódy MALDI-TOF MS.

Tabuľka 7: Vypočítané hodnoty konštánt radiálneho rastu pre vybrané vzorky kultúr kvasiniek.

Číslo kmeňa	r_t	MALDI
56	2,580	<i>Filobasidium wieringae</i>
65	2,777	
35	3,079	
II.43	3,175	
II.56	3,442	
II.46	3,571	
50	4,167	
9	2,777	<i>Filobasidium oeirense</i>
10	3,175	
51	1,110	Rovnaké
39	1,300	
38	1,984	Rovnaké
112.2	1,993	

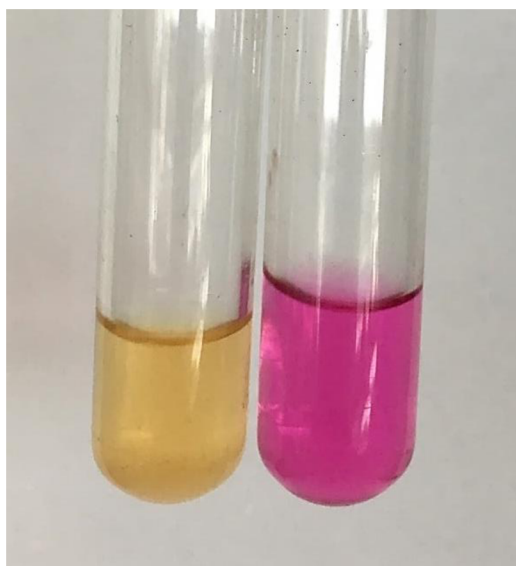
Napriek tomu, že konštanty radiálneho rastu boli medzi jednotlivými vzorkami odlišné, je možné určiť podobnosť, respektíve odlišnosť, jednotlivých vzoriek na základe vzhľadu narastených kvasinkových kolónií (Obrázok 15).



Obrázok 15: Vzhľad vybraných kvasinkových kultúr počas stanovenia ich konštanty radiálneho rastu.

5.2.2 Stanovenie prítomnosti ureázy

Stanovenie prítomnosti ureázy bolo sledované prostredníctvom farebnej zmeny média z pôvodnej žltej na ružovú farbu. Počas stanovenia dochádza k hydrolýze močoviny za vzniku amoniaku a karbamátu, ktorý sa následne rozkladá na kyselinu uhličitú a druhú molekulu amoniaku [5]. Vznikajúci amoniak alkalizuje médium, čo sa prejaví jeho farebnou zmenou média [48]. Zmena média bola sledovaná po dobu 12 dní, pričom všetky testované vzorky vykazovali pozitívnu zmenu, čo značí prítomnosť enzýmu ureázy v ich bunkách (Obrázok 16). Na základe pozitívnych výsledkov je možné usúdiť, že neznáme vzorky patria do skupiny kvasiniek rodov *Cryptococcus*, *Trichosporon* alebo *Rhodotorula*. Stanovením prítomnosti ureázy bolo potvrdené, že vybrané kmene izolované z prírodných zdrojov patria medzi bazidiomycétne kvasinky [5].



Obrázok 16: Stanovenie prítomnosti ureázy (žltá farba = negatívny test, ružová farba = pozitívny test).

5.2.3 Stanovenie asimilácie a fermentácie cukrov

Stanovenie asimilácie vybraných cukrov bolo sledované po dobu 5 dní pri 22 °C. Sledovaným parametrom bol nárast kultúry kvasiniek na danom C-médiu. Médiá z cukrov Inulín, Melibióza a Trehalóza mali výslednú koncentráciu 2%, preto na nich narástli všetky vzorky kultúr kvasiniek. Rovnaké médium s koncentráciou 10%, by už pre niektoré vzorky nebolo vhodné na rast. Takéto vzorky by na médiu so zvýšenou koncentráciou cukru nenarástli a vo výslednej Tabuľke 8 sú označené písmenom w. Pre ostatné vzorky nie je možné určiť, či by na viac koncentrovanom médiu narástli alebo nie. Médiá ostatných cukrov boli o koncentrácii 10% a narástli na nich všetky kmene testovaných kvasiniek (Tabuľka 8), a preto nebolo možné týmto testom jednotlivé kmene kvasiniek druhovo zaradiť, a teda vzorky, ktoré dosiahli v MALDI-TOF nejednoznačnú identifikáciu, boli určované podľa rastu v médiu bez prítomnosti vitamínov a rastu v prítomnosti alkoholov podľa Kurtzman a kol. [5].

Test stanovenia fermentácie sacharidov slúžil ako kontrolný test, keďže podľa Kurtzman a kol. kvasinky rodu *Cryptococcus* nepatria medzi fermentujúce rody kvasiniek [5]. Počas 15 dní bola sledovaná tvorba CO₂ v Durhamovej skúmavke. Vybrané vzorky kvasiniek boli porovnávané s referenčnou vzorkou, ktorá vykazovala tvorbu plynu v skúmavke. Počas celého stanovenia vzorky nefermentovali jednotlivé cukry, čím sa potvrdilo, že patria medzi nefermentujúce kmene.

Tabuľka 8: Výsledky stanovenia asimilácie cukrov.

	číslo kmeňa	Melibióza	Trehalóza	Inulín	Sacharóza	Rafinóza	Maltóza	Galaktóza	Laktóza		číslo kmeňa	Melibióza	Trehalóza	Inulín	Sacharóza	Rafinóza	Maltóza	Galaktóza	Laktóza
1	42	+	+	+	+	+	+	+	+	23	112	+	+	+	+	+	+	+	+
2	II.48	+	+	+	+	+	+	+	+	24	112.2	+	+	+	w+	+	+	+	+
3	28	w+	+	w+	+	+	+	+	+	25	II.35	+	+	w+	+	+	+	+	+
4	22	+	+	w+	+	+	+	+	+	26	II.40	w+	+	w+	+	+	+	+	+
5	III.1	+	+	+	+	+	+	+	+	27	II.56	w+	+	+	+	+	+	+	+
6	39	w+	+	w+	+	+	+	+	w+	28	110	+	+	w+	+	+	w+	+	+
7	51	+	+	+	+	+	+	+	+	29	3	+	+	+	+	+	+	+	+
8	35	+	w+	+	+	+	+	+	+	30	II.60	+	+	+	+	+	+	+	+
9	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	31	14	+	+	w+	+	+	+	+	+
10	II.62.2	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	32	38	+	+	+	+	+	+	+	+
11	II.62.3	ND	ND	ND	+	+	+	w+	w+	33	9	+	+	+	+	+	+	+	+
12	II.39	+	+	+	w+	+	+	+	+	34	10	w+	+	+	+	+	+	+	+
13	49	+	+	+	w+	+	w+	+	+	35	II.34	+	+	w+	+	+	+	+	+
14	113	+	w+	+	+	+	+	+	+	36	II.37	+	+	+	+	+	+	+	+
15	II.42	w+	+	w+	+	+	+	+	+	37	26	+	+	+	+	+	+	+	+
16	II.54	+	+	+	+	+	+	+	+	38	55	+	+	+	+	+	+	+	+
17	56	ND	ND	ND	+	+	+	+	w+	39	II.46	w+	+	w+	+	+	+	+	+
18	II.36	+	+	w+	+	+	+	+	+	40	6	w+	+	w+	+	+	+	+	+
19	II.43	ND	ND	ND	+	+	+	+	w+	41	50	+	+	+	+	+	+	+	+
20	65	w+	+	w+	+	+	+	+	+	42	II.53	+	+	+	+	+	+	+	+
21	2	+	+	w+	+	+	w+	w+	+	43	III.2	+	+	+	+	+	+	+	+
22	II.41	+	+	+	+	+	+	+	+	44	III.19	+	+	+	+	+	+	+	+

Pozn.: w+ – vzorky, ktoré by v 10% médiu sacharidu nenarástli, ND – kvasinková kultúra nenarástla

5.2.4 Stanovenie citlivosti na antimykotiká

Na stanovenie citlivosti kmeňov na antimykotiká boli použité fluconazol, voriconazol a antibiotikum actidion (cykloheximid s potvrdených antimykotických účinkom) [91]. Pri stanovení citlivosti na fluconazol a voriconazol boli použité komerčne dostupné disky, ktoré obsahovali 25 µg fluconazolu a 1 µg voriconazolu. Citlivosť na antibiotikum actidion bola testovaná prostredníctvom pripravených diskov s koncentraciami liečiva 10 mg/ml, 2 mg/ml, 0,2 mg/ml a 0,02 mg/ml. Pri stanovení citlivosti na antimykotiká fluconazol a voriconazol bolo z celkového počtu 54 testovaných vzoriek, 30 takých, kde kvasinky nerástli takže sa nedá zhodnotiť ich citlivosť na antimykotiká. Kvasinky kultivované na miskách s actidionom nenarástli v 29 prípadoch z 54. Z testovaných kmeňov boli štyri kmene, na ktoré nemala ani jedna koncentrácia actidionu vplyv a to boli vzorky č. 113, II.35, 62 a II.34. Kmeň č. 28 bol

jediný citlivý na celú sledovanú škálu koncentrácií actidionu (0,02 mg/ml) (Obrázok 17) (Tabuľka 9) a kmeň č. 57 bol citlivý v rozsahu koncentrácií 0,2 – 10 mg/ml. Na rozsah koncentrácií od 2 – 10 mg/ml bolo citlivých najviac kmeňov a to č. 22, 49, II.42, II.54, II.36, 52, II.41, 112.2, II.40, II.49, 110, II.60, 10 a II.62.3. Štyri kmene boli citlivé len na najvyššiu koncentráciu actidionu a to č. 42, 27, 112 a II.56. Kmene, ktorých citlivosť sa nedala určiť patrili zväčša k identifikovaným ako *F. wieringae*, ktoré nevykazujú žiadnu citlivosť na actidion ako uvádza Kurtzman a kol. [5] (Tabuľka 9). Na antimykotikum fluconazol bola preukázaná citlivosť kmeňov č. 42 a II.60 pričom na antimykotikum voriconazol bolo 10 kmeňov (27, II.62.2, II.62.3, 57, 52, II.41, 112.2, II.56, 110 a II.60). Voriconazol aj napriek nízkej koncentrácii na disku (1 µg) mal vyššiu antimykotickú aktivitu ako fluconazol, ktorého koncentrácia na disku bola 25 µg a boli naň citlivé len dva kmene (42 a II.60).

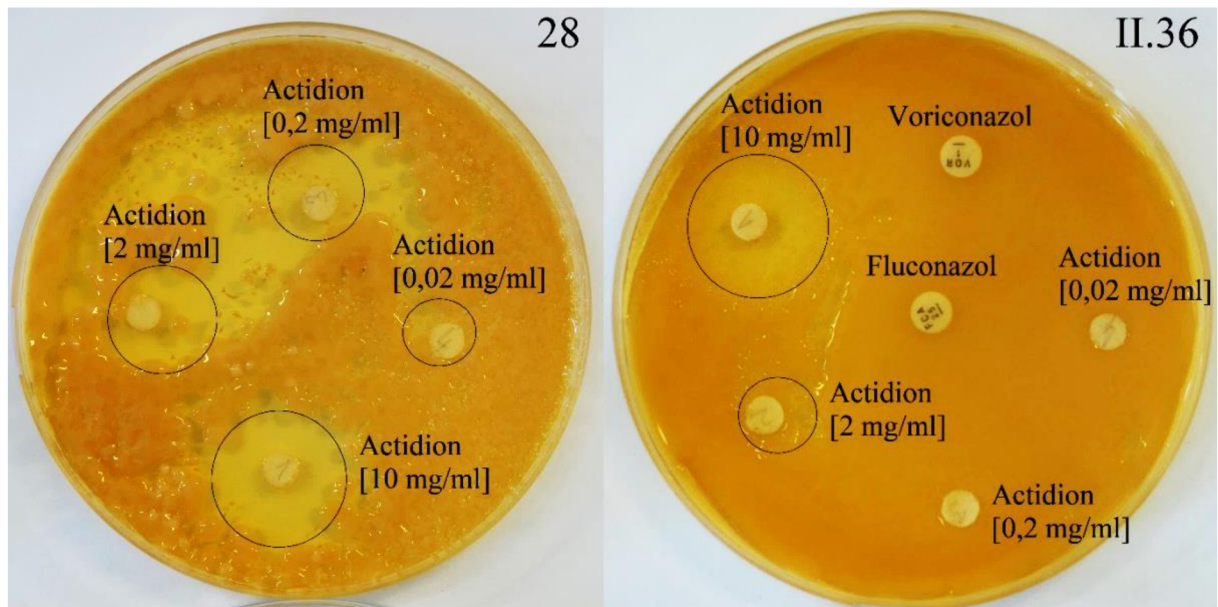
Tabuľka 9: Veľkosť inhibičných zón pri vybraných vzorkách v cm.

	číslo kmeňa	Actidion	Fluconazol	Voriconazol
1	42	1-0,2	0,5	0
2	II.48	ND	0	0
3	28	1-1,5; 2-0,8; 3-0,4; 4-0,2	ND	ND
4	22	1-1,5; 2-0,9	0	0
5	II.62.2	1-0,3; 2-0,3; 3-0,2	0	0,5
6	II.62.3	1-0,5; 2-0,4	0	0,3
7	II.54	1-0,7; 2-0,5	0	0
8	II.36	1-1; 2-0,4	0	0
9	II.41	1-0,2; 2-0,1	0	0,3
10	112	1-0,05	ND	ND
11	112.2	1-0,7; 2-0,2	0	0,2
12	II.40	1-0,4; 2-0,3	0	0
13	II.56	1-0,5	0	0,05
14	110	1-0,6; 2-0,3	0	0,2
15	II.60	1-1,9; 2-1,0	0,2	1
16	10	1-0,4; 2-0,6	ND	ND
17	17	ND	0	0
18	27	1-0,6	0	0,2
19	57	1-1,2; 2-0,6; 3-0,2	0	0,2
20	52	1-0,7; 2-0,6	0	0,6
21	II.49	1-0,8; 2-0,2	0	0
22	62	0	0	0

Pozn.: ND – kvasinková kultúra nenarástla, zelená – vzorky

identifikované MALDI-TOF MS ako *F. wieringae*

V Tabuľke 9 sú zvýraznené zelenou farbou kvasinkové kultúry, ktoré boli pomocou MALDI-TOF MS identifikované ako *F. wieringae*. Napriek tomu, že ide o rovnaký kmeň kvasiniek, vykazovali tieto vzorky rozdielnú citlivosť na dané liečivá, ktorá v prípade jedného druhu kvasiniek môže byť variabilná [5].



Obrázok 17: Inhibičné zóny actidionu na vzorke 28 (vľavo) a II.36 (vpravo).

5.2.5 Rast bez prítomnosti vitamínov

Pri tomto stanovení bola sledovaným parametrom tvorba a intenzita zákalu v skúmavke. Vzorky boli sledované po dobu 14 dní a výsledky rastu sú zhrnuté v Tabuľke 10. Väčšina vzoriek nebola schopná rásť bez vitamínov. Vzorky, ktoré mali najvyššiu intenzitu rastu, vykazovali už po prvom týždni nárast. Okolo skúmavky sa vytvoril prstenec a na dne sediment. Naopak vo vzorkách so žiadnou alebo nízkou intenzitou rastu sa vytvoril veľmi slabý prstenec a jemný zákal v prvom týždni, ale v druhom týždni už nebola pozorovaná žiadna zmena v raste.

5.2.6 Sledovanie rastu v prítomnosti alkoholov

Rovnako, ako v prechádzajúcom stanovení, bol rast kvasiniek v prítomnosti etanolu a glycerolu sledovaný po dobu 14 dní. Pozorovaným parametrom bol vznik zákalu a jeho intenzita v skúmavke. V nasledujúcej tabuľke sú uvedené súhrnné výsledky pre stanovenie rastu v prítomnosti alkoholov a rastu bez prítomnosti vitamínov (Tabuľka 10).

Tabuľka 10: Výsledky stanovenia rastu v prítomnosti etanolu, glycerolu a bez prítomnosti vitamínov.

	číslo kmeňa	Etanol	Glycerol	Bez vitamínov		Číslo kmeňa	Etanol	Glycerol	Bez vitamínov
1	42	++	++	w0	23	112	0	+	+++
2	II.48	w	+	w0	24	112.2	w	++	+++
3	28	+	+	0	25	II.35	+	+++	+
4	22	w0	w0	w0	26	II.40	+	+	+
5	III.1	++	++	+++	27	II.56	+	+	w0
6	39	+	+	w0	28	110	+	+	w0
7	51	w	+	+	29	3	+	++	+
8	35	0	+	0	30	II.60	+	++	+
9	1	w0	w0	+	31	14	0	+	+++
10	II.62.2	w	++	w	32	38	w	++	0
11	II.62.3	0	+	w0	33	9	0	w	0
12	II.39	++	++	++	34	10	0	w	0
13	49	+	++	w0	35	II.34	++	++	+++
14	113	w0	++	w0	36	II.37	++	++	+++
15	II.42	++	+++	w0	37	26	0	+	+++
16	II.54	w	w	w0	38	55	+++	+++	w0
17	56	0	w0	0	39	II.46	w	+	0
18	II.36	++	++	+++	40	6	0	+	w0
19	II.43	0	0	0	41	50	0	0	0
20	65	0	w0	0	42	II.53	0	0	w0
21	2	+	++	+++	43	III.2	0	++	w0
22	II.41	++	++	+++	44	III.19	+	+	w0

Pozn.: w0 – v prvom týždni jemné prejavy nárastu, ale v druhom týždni už nevykazovali nárast, + - prstenec a zákal, ++/+++ - nárast prstenca a silný zákal, ND – kvasinková kultúra nenarástla

Z Tabuľky 10 vyplýva, že zo 76 testovaných kmeňov nemalo schopnosť rásť bez vitamínov 59 kmeňov a 17 kmeňov malo schopnosť rásť aj bez vitamínov. Pri testoch schopnosti rásť v prítomnosti etanolu a glycerolu bolo sledovaných 40 vzoriek. V prítomnosti etanolu bolo schopných rásť 20 kmeňov a v prítomnosti glycerolu 33 kmeňov. Možné kombinácie rastu v prítomnosti etanolu a glycerolu boli ++, 0,+; 0,0; +,0 čo ukázalo, že najväčšia skupina (20 kmeňov) patrila k tým schopným rásť v prítomnosti etanolu aj glycerolu a druhá najväčšia skupina patrila (14 kmeňov) do skupiny, ktorá nebola schopná rásť v prítomnosti etanolu, ale v prítomnosti glycerolu áno. Ani jeden kmeň nepatrila do skupiny, ktoré boli schopné rásť v prítomnosti etanolu, ale v prítomnosti glycerolu nie. Šesť kmeňov nemalo schopnosť rásť v prítomnosti ani jedného alkoholu. Tieto výsledky podnietili vytvoriť skupiny aj s výsledkami bez vitamínov a túto troj-kombináciu použiť na vytvorenie skupín, ktoré by pomohli zatriediť

kmene, ktoré sa nepodarilo určiť pomocou MALDI-TOF. Na základe uvedených výsledkov boli následne určené možné druhy kvasiniek, ku ktorým boli priradené jednotlivé vzorky sledovaných kvasiniek. Keďže je možných viacero druhov pre jednotlivé troj-kombinácie, tak sú tieto vzorky kvasiniek riešené aj molekulárnou identifikáciou. Tabuľka 11 obsahuje zhrnutie skupín vytvorených troj-kombináciou testov s možnými druhmi, ktoré sa našli v prírode, aby sme sa pokúsili zaradiť zostávajúcich neidentifikovaných 28 vzoriek. Na základe uvedených výsledkov boli následne určené možné druhy kvasiniek, ku ktorým boli priradené jednotlivé vzorky sledovaných kvasiniek. Keďže je možných viacero druhov pre jednotlivé troj-kombinácie, tak sú tieto vzorky kvasiniek riešené aj molekulárnou identifikáciou.

Tabuľka 11: Výsledky pravdepodobnej identifikácie na základe mikrobiologických stanovení.

Potenciálne druhy	Etanol	Glycerol	Bez vitamínov	Vzorky
<i>Vishniacozyma heimaeyensis</i> (nektár, [92]), <i>Vishniacozyma victoriae</i> [92], <i>Cryptococcus tephrensis</i> (Island, [93])	0	+	0	II.48, III.2, 113, 51, 38
<i>Cryptococcus tephrensis</i> , <i>Saitozyma paraflavus</i> ([94], <i>Filobasidium magnum</i> [92], <i>Saitozyma flava</i> [95])	0	0	0	22, II.54, II.53, III.19
<i>Solicoccozyma aerea</i> [96], <i>Papiliotrema flavescens</i>	+	+	+	II.60, 55, 2, II.41, II.35, II.39, III.1, II.34, II.37, II.36
Najviac možných druhov, vybraté najviac pravdepodobné: <i>Genolevuria armeniacus</i> (časti rastlín, [97]), <i>Cryptococcus humicola</i> (voda, [97]), <i>Holtermanniella festucosa</i> [96], <i>Filobasidium magnum</i> [92], <i>Filobasidium wieringae</i> (pôda, [98]), <i>Filobasidium floriforme</i> (patogenita rastlín, [99])	+	+	0	55, 49, II.42, 42, 39, 28
<i>Solicoccozyma aerea</i> , <i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	+	+	26, 112, 112.2

Pozn.: 0 - žiaden nárast, + - prstenec a zákal, ++/+++ - nárast prstenca a silný zákal

6 ZÁVER

Hlavným cieľom diplomovej práce bola identifikácia 79 vzoriek kvasiniek rodu *Cryptococcus* vyskytujúcich sa na lúkach a záhradách pomocou metódy MALDI-TOF MS. Zároveň s týmto cieľom bol sledovaný vplyv dvoch kultivačných médií a 2 metód prípravy vzoriek na identifikáciu. Pomocou metódy MALDI-TOF MS bolo úspešne identifikovaných 51 vzoriek kvasiniek (65% úspešnosť identifikácie), čo radí túto metódu medzi najdôležitejšie v rámci identifikácie veľkého množstva vzoriek, ktoré sa spracováva pri sledovaní diverzity kvasiniek v prírode. Kmene identifikované pomocou MALDI-TOF MS boli zaradené do 3 taxonomických druhov – *Filobasidium magnum*, *Filobasidium oeirense* a *Filobasidium wieringae*. Z hľadiska vplyvu kultivačného média na výsledky identifikácie, sa pre kmene *F. magnum* a *F. wieringae* zdá vhodnejšie použitie sladínového agaru na kultiváciu. Pre kmeň *F. oeirense* odporúčame použiť na kultiváciu YPD-médium. Prostredníctvom metódy MALDI-TOF MS boli identifikované len tie vzorky odpovedajúce tomuto kmeňu, ktoré rástli na YPD-médium a boli pripravované prostredníctvom Brukerovej metódy úpravy vzorky v spojení so SAFA matricou. Spomenutá metóda v spojení so sladínovým agarom ako kultivačným médiom, vykazovala najvyšší podiel identifikovaných vzoriek. Táto metóda sa osvedčila hlavne vďaka použitiu etanolu a kyseliny mravčej na rozrušenie bunkovej membrány. Za vznik kvalitnejších spektier je zodpovedná SAFA matrica, ktorá je schopná ionizácie vyšších molekulárnych hmotností vyextrahovaných intracelulárnych proteínov. Použitie Brukerovej metódy a CHCA matrice bolo menej efektívne, keďže vyšší podiel identifikovaných vzoriek malo použitie SAFA matrice. Pomocou premývacej metódy prípravy vzorky sa nepodarilo identifikovať žiadnu zo stanovovaných vzoriek kvasiniek. Metóda poskytovala spektrá nedostatočnej kvality, čo mohlo byť spôsobené neschopnosťou rozrušiť bunkovú membránu, a tým vyextrahovať proteíny potrebné k identifikácii.

Vybrané vzorky boli ďalej podrobené stanoveniu charakteristík pomocou konvenčných mikrobiologických metód. Stanovenie prítomnosti ureázy potvrdilo, že vzorky patria do skupiny kvasiniek rodov *Cryptococcus*, *Trichosporon* alebo *Rhodotorula*. Keďže pri stanovení nastala u všetkých vzoriek farebná zmena média, tak všetky sledované vzorky vykazovali prítomnosť ureázy. Stanovenie konštanty radiálneho rastu neprinieslo očakávané výsledky vzhľadom k tomu, že jednotlivé vzorky mali rozdielne konštanty, na základe ktorých medzi nimi nebolo možné určiť jednoznačnú podobnosť. Sledovanie fermentácie vybraných cukrov potvrdilo, že kvasinky rodu *Cryptococcus* patria medzi nefermentujúce kmene. Pri stanovení asimilácie mali médiá z cukrov inulín, melibióza a trehalóza výslednú

koncentráciu 2%, namiesto požadovanej 10%. Preto na nich narástli všetky vzorky kultúr kvasiniek a pre niektoré z nich nebolo možné určiť, či by pri vyššej koncentrácii sacharidu narástli. Vzhľadom na dosiahnuté výsledky bolo toto stanovenie z identifikácie vyradené. Vzorky kvasiniek, ktoré vykazovali v MALDI-TOF MS nejednoznačnú identifikáciu, boli určované podľa rastu v médiu bez prítomnosti vitamínov a rastu v prítomnosti alkoholov. Na základe týchto stanovení boli vzorky zaradené k potenciálnym druhom. Kmene *Filobasidium magnum*, *Filobasidium oeirense* a *Filobasidium wieringae* majú rovnaké vlastnosti, takže nebolo možné podľa zvolených mikrobiologických testov zaradiť vzorky, ktoré vykazovali len možnú podobnosť, k jednému alebo dvom týmto druhom. Zo sledovaných 79 kmeňov zostalo 28, ktoré sa nepodarilo identifikovať zvolenými metódami a sú ďalej riešené molekulárnou identifikáciou, ktorá už nie je súčasťou tejto diplomovej práce.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] BUSSE, O. Über parasitare Zelleinschlusse und ihre Zuchtung. *Zentralbl. Bakteriol.* 1894, 16, 175-180.
- [2] BUSCHKE, A. Über eine durch Coccidien Hervergerufene Krankheit des menschen. *Deut. Med. Wochenschr.* 1895, 21(14).
- [3] SANFELICE, F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. *Ann. Igien.* 1894, 4, 463-495.
- [4] VUILLEMIN, P. Les blastomycetes pathogenes. *Rev. Gen. Sci. Pures Appl.* 1901, 12, 732-751.
- [5] KURTZMAN, C., FELL, J. W., BOEKHOUT, T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5th Edition. New York: Elsevier Science, 2011. ISBN 9780444521491.
- [6] ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 2004, 150(7), 2029-2035. DOI: 10.1099/mic.0.26980-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.26980-0>
- [7] LONGO, L., NAKAYASU, E., PIRES, J., GAZOS-LOPES, F., VALLEJO, M., SOBREIRA, T., ALMEIDA, I., PUCCIA, R. Characterization of lipids and proteins associated to the cell wall of the acapsular mutant *Cryptococcus neoformans* Cap 67. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2015, 62(5), 591-604. DOI: 10.1111/jeu.12213. ISSN 10665234. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jeu.12213>
- [8] WANG, Y., AISEN, P., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: Mechanism of action. *Infect. Immun.* 1995, 63(8), 3131–3136. ISSN 00199567.
- [9] SIMMERSECKO. A peach of a pathogen: *Cryptococcus neoformans*. In: The science creative quarterly [online]. 2003 [cit. 2019-9-13]. Dostupné z: <http://www.scq.ubc.ca/a-peach-of-a-pathogen-cryptococcus-neoformans/>

- [10] MAY, R., STONE, N., WIESNER, D., BICANIC, T., NIELSEN, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016, 14(2), 106-117. DOI: 10.1038/nrmicro.2015.6. ISSN 1740-1526.
Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro.2015.6>
- [11] DOERING, T. L. How does *Cryptococcus* get its coat?. *Trends Microbiol.* 2000, 8(12), 547-553. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)01890-4. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X00018904>
- [12] BOSE, I., REESE, A., ORY, J., JANBON, G., DOERING, T. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell.* 2003, 2(4), 655-663. DOI: 10.1128/EC.2.4.655-663.2003. ISSN 1535-9778.
Dostupné z: <https://ec.asm.org/content/2/4/655>
- [13] DOERING, T. L. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Ann. Rev. Microbiol.* 2009, 63(1), 223-247. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162753. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.62.081307.162753>
- [14] ZARAGOZA, O., NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Curr. Opin. Microbiol.* 2013, 16(4), 409-413. DOI: 10.1016/j.mib.2013.03.006. ISSN 13695274.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527413000386>
- [15] MCDONALD, T., WIESNER, D., NIELSEN, K. *Cryptococcus*. *Curr. Biol.* 2012, 22(14), 554-555. DOI: 10.1016/j.cub.2012.05.040. ISSN 09609822. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982212005933>
- [16] KWON-CHUNG, K. J. A New Genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia.* 1975, 67(6). DOI: 10.2307/3758842. ISSN 00275514.
Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/10.2307/3758842?origin=crossref>
- [17] SUN, S., HEITMAN, J. From two to one: Unipolar sexual reproduction. *Fungal Biol. Rev.* 2015, 29(3-4), 118-125. DOI: 10.1016/j.fbr.2015.06.002. ISSN 17494613.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1749461315000299>

- [18] BOVERS, M., HAGEN, F., BOEKHOUT, T. Diversidad del complejo de especies *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii*. *Rev. Iberoam. Micol.* 2008, 25(1), 4-12. DOI: 10.1016/S1130-1406(08)70019-6. ISSN 11301406. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130140608700196>
- [19] DI MENNA, M. E. Biological studies of some tussock-grassland soils. *New Zealand J. Agri. Res.* 2012, 1(6), 939-942. DOI: 10.1080/00288233.1958.10422396. ISSN 0028-8233. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00288233.1958.10422396>
- [20] YURKOV, A., RÖHL, O., PONTES, A., CARVALHO, C., MALDONADO, C., SAMPAIO, J., KURTZMAN, C. Local climatic conditions constrain soil yeast *diversity patterns* in Mediterranean forests, woodlands and scrub biome. *FEMS Yeast Res.* 2015, 16(1). DOI: 10.1093/femsyr/fov103. ISSN 1567-1364. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1093/femsyr/fov103>
- [21] SHAFIEE, R., NAHVI, I., EMTIAZI, G. Bioconversion of raw starch to SCP by coculture of *Cryptococcus aerius* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Sci.* 2005, 5(6), 717-723. DOI: 10.3923/jbs.2005.717.723. ISSN 17273048. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jbs.2005.717.723>
- [22] CLOSE, D., OJUMU, J., ZHANG, G. Draft genome sequence of *Cryptococcus terricola* JCM 24523, an oleaginous yeast capable of expressing exogenous DNA. *Genome Announcements.* 2016, 4(6), 01238-16. DOI: 10.1128/genomeA.01238-16. ISSN 2169-8287. Dostupné z: <https://mra.asm.org/content/4/6/e01238-16>
- [23] SAMPAIO, J. P. Utilization of low molecular weight aromatic compounds by heterobasidiomycetous yeasts: taxonomic implications. *Can. J. Microbiol.* 1999, 45(6), 491-512. DOI: 10.1139/w99-020. ISSN 0008-4166. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/w99-020>
- [24] BOTES, A., LOTTER, J., RHODE, O., BOTHA, A. Interspecies differences in the enantioselectivity of epoxide hydrolases in *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C.E. Skinner and *Cryptococcus podzolicus* (Bab'jeva & Reshetova) Golubev. *Syst. Appl.*

Microbiol. 2005, 28(1), 27-33. DOI: 10.1016/j.syapm.2004.10.003. ISSN 07232020.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S072320200400027X>

[25] INÁCIO, J. Yeast occurrence and diversity on the phylloplane of selected plants from the Arrábida Natural Park. Lisbon, 2003. PhD thesis (in Portuguese). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

[26] LIMA, G., DE CURTIS, F., CASTORIA, R., DE CICCIO, V. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. *Biocontrol Sci. Techn.* 1998, 8(2), 257-267. DOI: 10.1080/09583159830324. ISSN 0958-3157.

Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583159830324>

[27] PARK, B., WANNEMUEHLER, K., MARSTON, B., GOVENDER, N., PAPPAS, P., CHILLER, T. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS.* 2009, 23(4), 525-530. DOI: 10.1097/QAD.0b013e328322ffac. ISSN 0269-9370.

Dostupné z: <http://journals.lww.com/00002030-200902200-00012>

[28] RAJASINGHAM, R., SMITH, R., PARK, B. a kol. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2017, 17(8), 873-881. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30243-8. ISSN 14733099. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309917302438>

[29] HUSTON, S., MODY, C. Cryptococcosis: An emerging respiratory mycosis. *Clin. Chest Med.* 2009, 30(2), 253-264. DOI: 10.1016/j.ccm.2009.02.006. ISSN 02725231. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272523109000197>

[30] GALANIS, E., MACDOUGALL, L., KIDD, S., MORSHED, M. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerg. Infect. Dis.* 2010, 16(2), 251-257. DOI: 10.3201/eid1602.090900. ISSN 1080-6040. Dostupné z: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/2/09-0900_article.htm

[31] MACDOUGALL, L., KIDD, S., GALANIS, E. a kol. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg. Infect.*

Dis. 2007, 13(1), 42-50. DOI: 10.3201/eid1301.060827. ISSN 1080-6040. Dostupné z: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/1/06-0827_article.htm

[32] STEPHEN, C., LESTER, S., BLACK, W., FYFE, M., RAVERTY, S. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *Can. Vet. J.* 2002, 43(10), 792-794. ISSN 00085286.

[33] ESCANDÓN, P., QUINTERO, E., GRANADOS, D., HUÉRFANO, S., RUIZ, A., CASTAÑEDA, E. Aislamiento de *Cryptococcus gattii* serotipo B a partir de detritos de *Eucalyptus* spp. en Colombia. *Biomédica.* 2005, 25(3), 390-7. DOI: 10.7705/biomedica.v25i3.1363. ISSN 0120-4157.

Dostupné z: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1363>

[34] GUGNANI, H., MITCHELL, T., LITVINTSEVA, A., LENGELER, K., HEITMAN, J., KUMAR, A., BASU, S., PALIWAL-JOSHI, A. Isolation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from the flowers and bark of *Eucalyptus* trees in India. *Med. Mycol.* 2005, 43(6), 565-569. DOI: 10.1080/13693780500160785. ISSN 1369-3786. Dostupné z: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693780500160785>

[35] COGLIATI, M., D'AMICIS, R., ZANI, A. a kol. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS Yeast Res.* 2016, 16(4), 045. DOI: 10.1093/femsyr/fow045. ISSN 1567-1364.

[36] KOBAYASHI, C., SOUZA, L., FERNANDES, O., BRITO, S., SILVA, A., SOUSA, E., SILVA, M. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2005, 47(4), 203-207. DOI: 10.1590/S0036-46652005000400005. ISSN 0036-4665.

[37] JARVIS, J., PERCIVAL, A., BAUMAN, S. et al. Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin. Infect. Dis.* 2011, 53(10), 1019-1023. DOI: 10.1093/cid/cir613. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cir613>

- [38] SKOLNIK, K., HUSTON, S., MODY, C. Cryptococcal lung infections. *Clin. Chest Med.* 2017, 38(3), 451-464. DOI: 10.1016/j.ccm.2017.04.007. ISSN 02725231. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272523117300424>
- [39] GADE, W., HINNEFELD, S., BABCOCK, L.S. a kol. Comparison of the PREMIER Cryptococcal antigen enzyme immunoassay and the latex agglutination assay for detection of cryptococcal antigens. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29(8), 1616-1619. ISSN 00951137.
- [40] BAUGHMAN, R., RHODES, J., DOHN, M., HENDERSON, H., FRAME, P. Detection of cryptococcal antigen in bronchoalveolar lavage fluid: A prospective study of diagnostic utility. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992, 145(5), 1226-1229. DOI: 10.1164/ajrccm/145.5.1226. ISSN 0003-0805.
- Dostupné z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm/145.5.1226>
- [41] HABER, J., JESENSKÁ, Z., KRČMÉRY, V., MÁŠOVÁ, I. Systémové mykózy a jejich léčba. Praha: Galén, 1995. ISBN 80-858-2416-7.
- [42] LIMPER, A., KNOX, K., SAROSI, G. a kol. An official american thoracic society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011, 183(1), 96-128. DOI: 10.1164/rccm.2008-740ST. ISSN 1073-449X.
- Dostupné z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.2008-740ST>
- [43] PERFECT, J. R., DISMUKES, W. E., DROMER, F. a kol. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2010, 50(3), 291-322. DOI: 10.1086/649858. ISSN 1058-4838.
- Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/649858>
- [44] SANDLE, T. Pharmaceutical microbiology: Essentials for quality assurance and quality control. 1st Edition. Cambridge: Elsevier science & Technology, 2015. DOI: 10.1016/C2014-0-00532-1. ISBN 9780081000441.

- [45] KOCKOVA-KRATOCHVILOVA, A. Yeasts and yeast-like organisms. New York: Weinheim: VCH, 1990. ISBN 35-272-6162-1.
- [46] KOCKOVA-KRATOCHVILOVA, A. Katalóg kultúr kvasiniek/Catalogue of Yeast Cultures. Bratislava: Veda, 1997. ISBN 71-033-77.
- [47] KAVANAGH, K. (Ed.). F Fungi: Biology and Applications. 2nd Edition. John Wiley & Sons, 2011. DOI: 10.1002/9781119976950. ISBN 9780470977101.
- [48] ANDREWS, R. K., BLAKELEY, R. L., ZERNER, B. Urea and urease. In: Eichhorn and L.G. Marzilli (Eds.). *Adv. Inorg. Biochem.* New York: Elsevier, 1984, 6, 245-283.
- [49] ADAMS, E. D., COOPER, B. H. Evaluation of a modified Wickerham medium for identifying medically important yeasts. *Am. J. Med. Tech.* 1974, 40(9), 377-388. PMID: 4413293.
- [50] DEVADAS, S. M. Auxanographic carbohydrate assimilation method for large scale yeast identification. *J. Clin. Diagn. Res.* 2017. DOI: 10.7860/JCDR/2017/25967.9653. ISSN 2249782X.
- [51] PROCOP, G. W. Medically important fungi: A guide to identification – 5 th Edition. *Laboratory Medicine.* 2014, 45(2), 68-69. DOI: 10.1309/LMW8AT6W4EUIXYBP. ISSN 0007-5027. Dostupné z: <https://academic.oup.com/labmed/article-lookup/doi/10.1309/LMW8AT6W4EUIXYBP>
- [52] WICKERHAM, L., BURTON, K. Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *J. Bacteriol.* 1948, 56(3), 363-371. DOI: 10.1128/JB.56.3.363-371.1948. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://JB.asm.org/content/56/3/363>
- [53] VAN DER LANS, A., HOEKS, J., BRANS, B. a kol. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J. Clin. Inves.* 2013, 123(8), 3395-3403. DOI: 10.1172/JCI68993. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/68993>
- [54] PINCUS, D., ORENGA, S., CHATELLIER, S. Yeast identification – past, present, and future methods. *Med. Mycol.* 2007, 45(2), 97-121. DOI: 10.1080/13693780601059936.

ISSN 1369-3786. Dostupné z: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693780601059936>

[55] SHEREE LIN, C., FUNG, D. Conventional and rapid methods for yeast identification. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 2009, 14(4), 273-289. DOI: 10.3109/10408418709104441. ISSN 0045-6454.

Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408418709104441>

[56] BERG, J., TYMOCZKO, J., GATTO, G., STRYER, L. Biochemistry. Eighth edition. New York: W.H. Freeman, 2015. ISBN 978-1-4641-2610-9.

[57] PANCHAL, C.J. Yeast strain selection. 1st Edition. CRC Press, 1990. *Biotechnol. Bioproc.* ISBN 9780824782764.

[58] GODCHAUX, W., ADAMSON, S., HERBERT, E. Effects of cycloheximide on polyribosome function in reticulocytes. *J. Mol. Biol.* 1967, 27(1), 57-72. DOI: 10.1016/0022-2836(67)90351-8. ISSN 00222836.

Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022283667903518>

[59] MCKEEHAN, W., HARDESTY, B. The mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in rabbit reticulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1969, 36(4), 625-630. DOI: 10.1016/0006-291X(69)90351-9. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X69903519>

[60] JOSEPH-HORNE, T., HOLLOMON, D. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 149(2), 141-149. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10321.x. ISSN 03781097. Dostupné z:

<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10321.x>

[61] GHANNOUM, M., RICE, L. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 12(4), 501-517. DOI: 10.1128/CMR.12.4.501. ISSN 1098-6618. Dostupné z: <https://CMR.asm.org/content/12/4/501>

[62] RATHBUN, R., HOFFMAN, H. Review of the safety and efficacy of voriconazole. *Expert Opin. Invest. Drugs*. 2005, 11(3), 409-429. DOI: 10.1517/13543784.11.3.409. ISSN 1354-3784.

Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.11.3.409>

[63] VAN PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J. A brief comparison between in vivo DNA replication and in vitro PCR amplification. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008, 9-15. DOI: 10.1007/978-1-4020-6241-4_2. ISBN 978-1-4020-6240-7. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6241-4_2

[64] KADRI, K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen, 2020. DOI: 10.5772/intechopen.86491. ISBN 978-1-78984-089-6. Dostupné z:

<https://www.intechopen.com/books/synthetic-biology-new-interdisciplinary-science/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-and-applications>

[65] GARIBYAN, L., AVASHIA, N. Polymerase Chain Reaction. *J. Invest. Dermatol.* 2013, 133(3), 1-4. DOI: 10.1038/jid.2013.1. ISSN 0022202X.

Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1536139X>

[66] KIENITZ, H. *Massenspektrometrie*. 1st edition: Verlag Chemie: Weinheim, 1968.

[67] GROSS, J.H. *Mass spectrometry: a textbook*. 2nd ed. Berlin: Springer, 2011. ISBN 978-364-2107-092.

[68] MILATA, V., SEGLA, P. *Vybrané metódy molekulovej spektroskopie*. Bratislava: STU, 2007. ISBN 978-802-2726-184.

[69] KAKLAMANOS, G., APREA, E., THEODORIDIS, G. Mass spectrometry: Principles and instrumentation. *Encyclopedia of food and health*. Elsevier, 2016, 661-668. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00447-5. ISBN 9780123849533.

Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849472004475>

- [70] FRIEDECKÝ, D., LEMR, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* 2012, 20(41), 152-157. ISSN 12107921.
- [71] AMAD, M., CECH, N., JACKSON, G., ENKE, C. Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. *J. Mass Spectrometry.* 2000, 35(7), 784-789. DOI: 10.1002/1096-9888(200007)35:7<784::AID-JMS17>3.0.CO;2-Q. ISSN 10765174.
- [72] CRISTONI, S., BERNARDI, L. Development of new methodologies for the mass spectrometry study of bioorganic macromolecules. *Mass Spectrom. Rev.* 2003, 22(6), 369-406. DOI: 10.1002/mas.10062. ISSN 0277-7037.
- Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mas.10062>
- [73] BANERJEE, S., MAZUMDAR, S. Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int. J. Anal. Chem.* 2012, 1-40. DOI: 10.1155/2012/282574. ISSN 1687-8760. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijac/2012/282574/>
- [74] KARAS, M., HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 2002, 60(20), 2299-2301. DOI: 10.1021/ac00171a028. ISSN 0003-2700.
- Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00171a028>
- [75] DONEGAN, M., TOMLINSON, A., NAIR, H., JUHASZ, P. Controlling matrix suppression for matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2004, 18(17), 1885-1888. DOI: 10.1002/rcm.1568. ISSN 0951-4198.
- Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.1568>
- [76] POETZSCH, M., STEUER, A., HYSEK, C., LIECHTI, M., KRAEMER, T. Development of a high-speed MALDI-triple quadrupole mass spectrometric method for the determination of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in oral fluid. *Drug Testing and Analysis.* 2016, 8(2), 235-240. DOI: 10.1002/dta.1810. ISSN 19427603.
- Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/dta.1810>

- [77] VEERAVALLI, V., MOHAN VAMSI MADGULA, L., SRIVASTAVA, P. Mass spectrometry as a workhorse for preclinical drug discovery: special emphasis on drug metabolism and pharmacokinetics. *Mass Spectrometry - Future Perceptions and Applications*. IntechOpen, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.88385. ISBN 978-1-83962-756-9. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/mass-spectrometry-future-perceptions-and-applications/mass-spectrometry-as-a-workhorse-for-preclinical-drug-discovery-special-emphasis-on-drug-metabolism->
- [78] TODD, J. F. J. Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectroscopy (including an appendix of terms used in vacuum technology). (Recommendations 1991). *Pure Appl. Chem.* 1991, 63(10), 1541-1566. DOI: 10.1351/pac199163101541. ISSN 1365-3075. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.1991.63.issue-10/pac199163101541/pac199163101541.xml>
- [79] MARCH, R. E. Quadrupole ion traps. *Mass Spectrometry Reviews*. 2009, 28(6), 961-989. DOI: 10.1002/mas.20250. ISSN 02777037. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mas.20250>
- [80] MAKAROV, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* 2000, 72(6), 1156-1162. DOI: 10.1021/ac991131p. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac991131p>
- [81] PLATZNER, I. T. *Modern isotope ratio mass spectrometry*. 1st Edition. B.m.: Wiley: Chichester, 1997, 530 s. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0231(19980615)12:11<749::AID-RCM214>3.0.CO;2-I. ISBN 978-0-471-97416-1.
- [82] OHRING, M. *Engineering materials science*. 1st Edition. Academic Press, 1995, 827 s. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-524995-9.X5023-5>. ISBN 9780080505695.
- [83] MEDHE, S. Mass spectrometry: Detectors review. *Chem Biomol. Eng.* [online]. 2018, 3(4), 51-58 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.11648/j.cbe.20180304.11. ISSN 2578-8884. Dostupné z: <http://www.sciencepublishinggroup.com/journal/index?journalid=243>

[84] GIEBEL, R., WORDEN, C., RUST, S. M., KLEINHEINZ, G. T., ROBBINS, M., SANDRIN, T.R. Microbial fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Elsevier, 2010, , 149-184. *Adv. Appl. Microbiol.* DOI: 10.1016/S0065-2164(10)71006-6. ISBN 9780123809933.

Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216410710066>

[85] CROXATTO, A., PROD'HOM, G., GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012, 36(2), 380-407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x. ISSN 1574-6976.

Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>

[86] PUSCH, W., FLOCCO, M., LEUNG, S., THIELE, H., KOSTRZEWA, M. Mass spectrometry-based clinical proteomics. *Pharmacogenomics.* 2003, 4(4), 463-476. DOI: 10.1517/phgs.4.4.463.22753. ISSN 1462-2416.

Dostupné z: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.1517/phgs.4.4.463.22753>

[87] BRUKER. MALDI Biotyper® CA System clinical application for identification of microorganisms [online]. 2018 [cit. 2020-03-13].

Dostupné z: [https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1857366_MALDI_Biotyper_CA_brochure_01-2018_ebook.pdf)

[Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1857366_MALDI_Biotyper_CA_brochure_01-2018_ebook.pdf](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1857366_MALDI_Biotyper_CA_brochure_01-2018_ebook.pdf)

[88] GOLUBEV, W. I. Capsules. ROSE, Antony a John HARRISON. The Yeasts: Yeast organelles. 2nd edition. London: Academic Press Limited, 1991, s. 175-198, 765 s. Yeast Genetics, Vol. 4. ISBN 9780125964142.

[89] GOLUBEV, W. I., MANUKIAN, A. R. Capsule formation in saprophytic yeasts. *Mikrobiologija.* 1979, 48(2), 314-318.

[90] JÄGER, J. Biotypizácia kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* hmotnostnou spektrometriou. Brno, 2014. Diplomová práce. Vysoké učení *technické* v Brně, Fakulta chemická.

- [91] WHIFFEN, A. J. The production, assay, and antibiotic activity of actidione, an antiobiotic from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 1948, 56(3), 283-291. PMID: 16561572.
- [92] MITTELBACH, M., YURKOV, A., NOCENTINI, D., NEPI, M., WEIGEND, M., BEGEROW, D. Nectar sugars and bird visitation define a floral niche for basidiomycetous yeast on the Canary Islands. *BMC Ecol.* 2015, 15(1). DOI: 10.1186/s12898-015-0036-x. ISSN 1472-6785.
Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1472-6785/15/2>
- [93] VISHNIAC, H. S. *Cryptococcus tephrensis*, sp.nov., and *Cryptococcus heimaeyensis*, sp.nov.; new anamorphic basidiomycetous yeast species from Iceland. *Can. J. Microbiol.* 2002, 48(5), 463-467. DOI: 10.1139/w02-041. ISSN 0008-4166. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/w02-041>
- [94] GOLUBEV, W., SAMPAIO, J., GADANHO, M., GOLUBEVA, E. *Cryptococcus paraflavus* sp. nov. (Tremellales), isolated from steppe plants in Russia. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2004, 50(2), 65-69. DOI: 10.2323/jgam.50.65. ISSN 0022-1260. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jgam/50.65?from=CrossRef>
- [95] GLUSHAKOVA, A., CHERNOV, I. Seasonal dynamics in a yeast population on leaves of the common wood *Sorrel Oxalis acetosella* L. *Microbiology.* 2004, 73(2), 184-188. DOI: 10.1023/B:MICI.0000023987.40253.2d. ISSN 0026-2617. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:MICI.0000023987.40253.2d>
- [96] VADKERTIOVÁ, R., DUDÁŠOVÁ, H., STRATILOVÁ, E., BALAŠČÁKOVÁ, M. Diversity of yeasts in the soil adjacent to fruit trees of the Rosaceae family. *Yeast.* 2019, 36(10), 617-631. DOI: 10.1002/yea.3430. ISSN 0749-503X. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/yea.3430>
- [97] GOLUBEV, W.I., GOLUBEVA, E.W. Yeasts of in steppe and forest phytocoenoses of Prioksko- terrasny biosphere reserve. *Mikol. Fitopat.* 2004, 38(6), 20-27.
- [98] ARENZ, B., HELD, B., JURGENS, J., FARRELL, R., BLANCHETTE, R. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biol.*

Biochem. 2006, 38(10), 3057-3064. DOI: 10.1016/j.soilbio.2006.01.016. ISSN 00380717.

Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071706000964>

- [99] FILONOW, A.B., VISHNIAC, H.S., ANDERSON, J. A., JANISIEWICZ, W. J. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biol. Control.* 1996, 7(2), 212-220. DOI: 10.1006/bcon.1996.0086. ISSN 10499644. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964496900869>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

AFM	mikroskopia atomárnych síl, z angl. Atomic Force Microscopy
CHCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová
CNS	centrálny nervový systém
DBB	diazóniová modrá B
DPPA	auxanografická metóda, z angl. Dye Pour-Plate Auxanogram
ESI	ionizácia elektrosprejom, z angl. Electrospray ionization
FA	kyselina ferulová
FT-ICR	cyklotronová rezonancia s Fourierovou transformáciou, z angl. Fourier-transform ion cyclotron resonance
GalXM	galaktoxylomannan
GXM	glukuronoxylomannan
LP MID	lineárny pozitívny mód
MALDI	desorpčná ionizácia laserom za účasti matrice, z angl. Matrix-assisted laser desorption/ionization
m/z	pomer hmotnosti k náboju, z angl. mass-to-charge ratio
PCR	polymerázová reťazová reakcia, z angl. Polymerase Chain Reaction
SA	kyselina sinapová
SAFA	zmes kyseliny sinapovej a ferulovej
SBCHCA	metóda kultivácie vzoriek na sladinovom agare a ich následnej prípravy pomocou Brukerovej metódy s použitím CHCA matrice
SBSAFA	metóda kultivácie vzoriek na sladinovom agare a ich následnej prípravy pomocou Brukerovej metódy s použitím SAFA matrice
SVoda	metóda kultivácie vzoriek na sladinovom agare a ich následnej prípravy pomocou premývacej metódy
TOF	prieletový analyzátor, z angl. time-of-flight

TOF1	prvý preletový analyzátor
TOF2	druhý preletový analyzátor
YBCHCA	metóda kultivácie vzoriek na YPD médiu a ich následnej prípravy pomocou Brukerovej metódy s použitím CHCA matrice
YBSAFA	metóda kultivácie vzoriek na YPD médiu a ich následnej prípravy pomocou Brukerovej metódy s použitím SAFA matrice
YVoda	metóda kultivácie vzoriek na YPD médiu a ich následnej prípravy pomocou premývacej metódy