

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra botaniky**



**DETEKCE A VÝSKYT  $\beta$ -GLUKANU U LÉKAŘSKY  
VÝZNAMNÝCH KVASINEK RODU *CANDIDA***

**Diplomová práce**

**Bc. Jan Wipler**

Botanika

Prezenční forma studia

**Vedoucí práce: doc. MUDr. Petr Hamal, Ph. D.**

Olomouc 2013

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně pod vedením doc. MUDr. Petra Hamala, Ph.D. a uvedl v ní všechny použité prameny a zdroje.

V Olomouci 10. ledna 2013

## **Poděkování:**

Děkuji doc. MUDr. Petru Hamalovi, Ph.D. za vedení diplomové práce, srozumitelné vysvětlení metodiky pokusů a jejího celého smyslu. Velký dík patří i MUDr. Vladislavu Raclavskému, Ph.D. za cenné konzultace k metodice experimentu o průběhu růstových křivek jednotlivých druhů kvasinek. Dále děkuji doktorandkám MDDr. Lucii Svobodové a Mgr. Kristýně Hricové za laskavé zapůjčení kvasinkových kultur ze sbírky mikroorganismů LF UP v Olomouci. Děkuji také Mgr. Markétě Šenkyříkové za vysvětlení obsluhy spektrofotometru. Rovněž děkuji celému personálu a vedení Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty UP v Olomouci za vytvoření podmínek a prostoru k vypracování mé diplomové práce.

Můj velký dík patří firmě Biogenix, s. r. o. a RNDr. Michaelae Zemánkové, Ph.D. za detailní popis metodiky a trpělivou instruktáž při testování množství vyprodukovaného (1→3)-β-D-glukanu u jednotlivých kmenů kvasinkových druhů pomocí soupravy Fungitell.

Děkuji i bývalému vedoucímu Katedry botaniky PřF UP Prof. Ing. Aleši Lebedovi, Dr.Sc., jakož i současnému vedoucímu katedry doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, Ph.D. za laskavé svolení k vypracování mé diplomové práce. Jsem velmi zavázán doc. RNDr. Michaelae Sedlářové, Ph.D. za umožnění přístupu k mikroskopům a fotodokumentačním zařízením Laboratoře konfokální mikroskopie PřF UP.

Práce byla podpořena grantovým projektem IGA UP č. LF\_2012\_006.

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora: Jan Wipler

Název práce: Detekce a výskyt  $\beta$ -glukanu u lékařsky významných kvasinek rodu *Candida*

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Ústav mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt: Byly srovnávány vlastnosti deseti druhů patogenních kvasinek rodu *Candida* kultivovaných na tekutém médiu RPMI kvůli zjištění jejich exponenciální a stacionární fáze růstu ve vhodném definovaném prostředí pomocí spektrofotometru. Byly vytvořeny křivky nárůstu biomasy pro jednotlivé druhy. Hodnoty absorpance byly vyjádřeny za časovou jednotku uvedenou v hodinách.

Od každého druhu bylo vybráno pět kmenů a měřena hmotnost sušiny z vyprodukované biomasy v obou těchto fázích zvlášť. Před vysušením byl odebrán stanovený objem supernatantu ze zcentrifugované suspenze média RPMI pro detekci glukánů biochemickou soupravou Fungitell. Zkumavka s odebraným supernatantem byla hluboce zamražena.

(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan byl detekován diagnostickou soupravou Fungitell (Associates of Cape Cod) za použití doporučených laboratorních potřeb a reagensů zcela prostých jakéhokoli glukanu a endotoxinu. Souprava je založená na detekci (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukanu pomocí lyzátu hemolymfových buněk imunitního systému ostrorepa rodu *Limulus*. Bylo zjišťováno, zda se liší množství vyloučeného  $\beta$ -glukanu u testovaných druhů v exponenciální a stacionární fázi růstu.

Klíčová slova: (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan, kvasinky rodu *Candida*, kinetický fotometr, růstová křivka exponenciální fáze, stacionární fáze, *Limulus*' amebocyte lyzát, biomasa, Fungitell

Počet stran: 89

Počet příloh: 12

Jazyk: čeština

## The bibliographical identification

Autor's first name and surname: Jan Wipler

Title: Presence and detection of  $\beta$ -glucan in medically important *Candida* yeasts

Type of thesis: magister

Department: Institute of Microbiology of Medicinal faculty Palackiana University

Supervisor: doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Abstract: The features of ten species of the pathogenic yeasts organisms from the genus *Candida* were cultured in the liquid medium RPMI to find out their exponential and stationary phase of growth in defined media using a spectrophotometer. Curves of increase of the biomass were created for individual species. The values of absorbance were expressed in a time unit and expressed in hours.

Five strains was chosen of each species and weigh of dry matters was measured separately in both phases. Prior to the exsiccation, the determined volumes of supernatant from centrifuged suspension of RPMI medium had been taken for detection of  $\beta$ -glucans by the biochemical set called Fungitell. The (ACC) test tubes with supernatant were deep frozen.

The (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan was detected by the diagnostic kit Fungitell using endotoxin-free and glucan-free laboratory equipments and reagents. The diagnostic kit Fungitell is based on detection of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan by the *Limulus*'s hemolymph cells. It was probed whether quantity of the produced  $\beta$ -glucan is differed between tested species during the exponential and stationary phases of yeast's growth.

Keywords: (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan, *Candida* yeast, kinetic photometer, growth curve, exponential phase, stationary phase, *Limulus*' amebocyte lysate, biomass, Fungitell

Number of pages: 89

Number of appendices: 12

Language: czech

# OBSAH

ÚVOD.....	8
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST: PŘEHLED PROBLEMATIKY .....</b>	<b>11</b>
1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA.....	11
1.1.2 <i>Metabolismus kvasinek</i> .....	13
1.1.3 <i>Reprodukce kvasinek</i> .....	16
1.2 VÝZNAM KVASINEK V MEDICÍNĚ .....	20
1.2.1 <i>Charakteristika kandidóz</i> .....	20
1.2.2 <i>Popis studovaných druhů kvasinek</i> .....	21
1.3 DIAGNOSTIKA KVASINKOVÝCH INFEKČÍ.....	29
1.3.1 <i>Kultivace</i> .....	29
1.3.2 <i>Mikroskopie</i> .....	30
1.3.3 <i>Sérologie</i> .....	31
1.3.4 <i>Biochemické testy</i> .....	32
1.3.5 <i>Molekulárně biologické metody</i> .....	33
1.4 B-GLUKAN U KVASINEK.....	33
1.4.1 CHARAKTERIZACE B-GLUKANŮ.....	33
1.4.2 <i>Využití <math>\beta</math>-glukanu v diagnostice</i> .....	37
1.4.2.1 DIAGNOSTICKÁ SOUPRAVA FUNGITELL .....	39
<b>2. CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>42</b>
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>43</b>
3.1 MATERIÁLY A POSTUPY .....	43
3.1.1 <i>Přístroje a materiál</i> .....	43
3.1.1.1 KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	43
3.1.1.2 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	43
3.1.3 <i>Metodický postup</i> .....	45
3.1.3.2 NORMALIZACE B-GLUKANU NA SUCHOU HMOTU KULTUR.....	46
3.1.3.3 MĚŘENÍ KONCENTRACE B-GLUKANU .....	46
3.1.2.5 STATISTICKÉ HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ.....	47
3.2 VÝSLEDKY .....	47
3.2.1 <i>Stanovení růstové křivky kvasinek</i> .....	47
3.2.2 <i>Normalizace <math>\beta</math>-glukanu na suchou hmotu kultur</i> .....	53
3.2.3 <i>Měření koncentrace <math>\beta</math>-glukanu</i> .....	54
3.1.2.4 VÝPOČET HMOTNOSTI B-GLUKANU .....	56

3.2.5. <i>Statistické hodnocení výsledků</i> .....	57
<b>4. DISKUZE</b> .....	63
4.1 STANOVENÍ RŮSTOVÉ KŘIVKY KVASINEK .....	63
4.2 PRODUKCE BIOMASY A HMOTNOST SUŠINY .....	64
4.3 KONCENTRACE B-GLUKANU.....	64
4.4 ANALÝZA DAT .....	66
<b>5. ZÁVĚR</b> .....	67
<b>6. PŘEHLED LITERATURY</b> .....	69
<b>7. SEZNAMY</b> .....	76
7.1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	76
7.2 SEZNAM OBRÁZKŮ .....	76
7.3 SEZNAM TABULEK.....	77
7.4 SEZNAM GRAFŮ.....	77
7.5 SEZNAM SCHÉMAT .....	77
<b>8. PŘÍLOHY</b> .....	78

# ÚVOD

Veškeré houbové mikroorganismy mají heterotrofní výživu. Vedle vláknitých hub využívají organický substrát jako zdroj energie k růstu i houby, jejichž stélku tvoří často pouze jednotlivá buňka. Tyto zdánlivě jednoduché mikroorganismy nazýváme pro jejich schopnost fermentovat nejrůznější sacharidy pravými kvasinkami. Existují však také organismy morfologicky téměř totožné s kvasinkami, ale bez schopnosti zkvašovat uhlíkatý substrát. Ty se v systematické mykologii označují jako kvasinky nepravé (Kalina et Váňa 2005; Kocková-Kratochvílová 1990).

Stélka kvasinek může být tvořena jednak jednotlivými buňkami, pseudomyceliem nebo i pravým septovaným myceliem (Bednář et al. 2009). Je pro ně typická naprostá absence jakéhokoli náznaku plodnice (Kalina et Váňa 2005).

Základní jednotkou stélky kvasinek, jak již bylo zmíněno, je typická eukaryotická buňka s lineární DNA uloženou v jádře, řadíme je proto do nadříše Eukaryota (Madigan et al. 2012). Taxonomicky kvasinky patří do říše Fungi. Kvasinkové mykoorganismy jsou dosti heterogenní skupinou. Jsou to organismy velmi odlišných vlastností. Liší se mezi sebou fyziologicky, ekologicky, morfologicky a pochopitelně tedy i na úrovni genomu. Jejich společnou vlastností je vysoká biochemická aktivita. Většina z nich je schopna zkvašovat různé sacharidy za tvorby organických alkoholů, čehož se u některých druhů hojně využívá v potravinářském průmyslu (Šilhánková 2002).

U některých kvasinek nebylo zjištěno sexuální rozmnožování a tedy ani pohlavní tzv. perfektní stádium (teleomorfa), a proto se nazývají jen podle svého nepohlavního stádia-anamorfy (Kalina et Váňa 2005). V taxonomickém názvosloví stanovené Mezinárodním kódem botanické nomenklatury má název teleomorfy přednost před názvem anamorfy, avšak v lékařství se názvy anamorf natolik vžily, že se používají častěji (Otčenášek et al. 1990).

Pravé kvasinky se v taxonomickém systému řadí do oddělení Ascomycota (houby vřecovýtrusné), a proto je nazýváme askomycetárními kvasinkami (Šilhánková 2002).

## **Klasifikace pravých (askomycetárních) kvasinek dle Kaliny a Váni (2005)**

- **Oddělení:** Ascomycota
- **Pododdělení:** Saccharomycotina (syn. Hemiascomycotina)
- **Třída:** Saccharomycetes
- **Řád:** Saccharomycetales (syn. Endomycetales „pravé kvasinky“)
- **Čeled:** Saccharomycetaceae



- **Rody:** *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Endomyces* aj.

U těchto rodů prokázaly genetické studie nukleotidových sekvencí v DNA úzkou příbuznost až na druhové úrovni s některými anamorfními patogeny rodů *Candida*, *Trichosporon* či *Geotrichum*. Tyto anamorfy lze proto zařadit mezi askomycetární kvasinky (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

Výjimku tvoří rod *Schizosaccharomyces*, který, rovněž askomycetární, však mezi pravé kvasinky nepatří. Geneticky se odlišuje již na úrovni pododdělení. Molekulární studie potvrdily, že genom *Schizosaccharomyces* se podobá genomu pravých kvasinek jen velmi vzdáleně. Liší se složením buněčné stěny, což je významný evoluční trend (Kalina et Váňa 2005). Je výrazně termotolerantní (Kocková-Kratochvílová 1990). Jako patogen se zřejmě neuplatňuje žádný zástupce. Typovým druhem je zde *Schizosaccharomyces pombe*, který byl izolován z afrického prosového piva „pombe“ (Kocková-Kratochvílová 1990).

#### **Klasifikace schizosacharomycetních (askomycetárních) kvasinek dle Kaliny a Váni (2005)**

- **Oddělení:** Ascomycota
- **Pododdělení:** Taphrinomycotina
- **Třída (monotypická):** Schizosaccharomycetes
- **Řád (monotypický):** Schizosaccharomycetales
- **Čeleď (monotypická):** Schizosaccharomycetaceae
- **Rod:** *Schizosaccharomyces*

Kvasinky nepravé náleží oddělení Basidiomycota, lze je tedy nazvat kvasinkami basidiomycetárními (Kocková-Kratochvílová 1990).

#### **Klasifikace nepravých (basidiomycetárních) kvasinek dle Kaliny a Váni (2005)**

- **Oddělení:** Basidiomycota
- **Pododdělení:** Heterobasidiomycetidae
- **Třída:** Agaricomycetes (syn. Basidiomycetes)
- **Podtřída:** Tremellomycetidae
- **Řády:** Filobasidiales, Cystofilobasidiales
- **Čeleď:** Filobasidiaceae, Cystofilobasidiaceae
- **Rody:** *Rhodosporidium*, *Filobasidium*, *Filobasidiella*, *Cystofilobasidium* aj.

Uvedené perfektní (teleomorfní) rody patří k imperfektním (anamorfním) rodům významných živočišných patogenů včetně člověka jako jsou *Cryptococcus*, *Rhodotorula* či *Malassezia* (Kalina et Váňa 2005).

# 1. TEORETICKÁ ČÁST: PŘEHLED PROBLEMATIKY

## 1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA

### 1.1.1 Obecná charakteristika buňky kvasinek

Velikost buňky lékařsky nejvýznamnějšího druhu kvasinky, *Candida albicans* je 3-5 x 3-15 μm (Bednář et al. 2009). Buňka kvasinek se obvykle skládá z buněčné stěny, cytoplazmatické membrány a živého obsahu buňky tzv. protoplastu, který obsahuje cytoplazmu a v ní uložené organely a rozpuštěné ionty (Rose et Harrison 1969; Šilhánková 2002).

Vnější prostředí a vnitřní obsah buněk kandid jsou odděleny buněčnou stěnou a pod ní uloženou cytoplazmatickou membránou skládající se z typické fosfolipidové dvojvrstvy a na ni navázaných periferních či integrálních proteinů (Lindegren 1949; Procházka et al. 1999). Nedílnou součástí cytoplazmatické membrány jako u všech hub je ergosterol (<http://people.upei.ca/jlewis/Mycology-I-2011.pdf>).

Cytoplazmatická membrána ohraničuje polotekutou cytoplazmu, ve které jsou uloženy všechny buněčné organely. U mladých kvasinek je průhledná a homogenní, stářím se její absorpance zvyšuje. Udržuje stálost vnitřního prostředí a jsou v ní rozpuštěny pro buňku potřebné ionty a molekuly, jejichž vzájemný poměr závisí na jejich příjmu a výdeji přes cytoplazmatickou membránu a póry v buněčné stěně (Kubišta 1998).

Endomembránový systém sestává především z endoplazmatického retikula, které tvoří vnější jadernou membránu a rozrůstá se v podobě lamel odstředivě do celého protoplastu, a Golgiho aparátu, jehož ploché cisterny, diktyozómy, jsou lokalizovány spíše směrem k cytoplazmatické membráně, přes níž kvasinka distribuuje v transportních váčcích např. prekurzory pro stavbu buněčné stěny (Kocková-Kratochvílová 1990; Šilhánková 2002). Obě tyto struktury jsou nezbytné pro komunikaci s organelami v buňce i intercelulární komunikaci v podobě transportních váčků. Součástí endomembránového systému jsou také jednodušší organely jako peroxyzomy, glyoxyzomy, vakuoly nebo zásobní tuková tělíska tzv. oleazomy (Procházka et al. 1999).

Nejnápadnější organelou celé buňky je vakuola. U kvasinek je centrálně uložená a má kulovitý tvar. Je ohraničená jednoduchou membránou, tonoplastem. U mladých kvasinek se v buňce nalézá větší počet drobných vakuol, které stářím buňky fúzí za vzniku jedné velké vakuoly vyplňující většinu protoplastu. Vakuola obsahuje hydrolytické enzymy pro rozklad

vlastních buněčných struktur a ve vodě rozpustné látky sloužící jako rezerva (Kocková-Kratochvílová 1990).

Semiautonorní organely, jako jsou mitochondrie, mají vlastní genetickou výbavu v podobě DNA a RNA, která je zodpovědná za extranukleární dědičnost kvasinek a schopnost dělení dle potřeb buňky (Kocková-Kratochvílová 1990; Šilhánková 2002).

Mitochondrie jsou vystavěny z proteinů, lipidů a fosfolipidů. Jsou v nich lokalizovány důležité procesy pro získávání energie jako oxidativní fosforylace coby součást buněčné aerobní respirace či Krebsův cyklus, nepostradatelný pro produkci ATP. Nachází-li se buňka v prostředí bez kyslíku, dochází k redukci počtu a velikosti mitochondrií. Po opětovném okysličení jsou jejich velikost a počet v buňkách kvasinek znovu obnoveny. Narozdíl od ostatních eukaryotních buněk probíhá betaoxidace mastných kyselin v peroxyzómech a nikoli v mitochondriích (Zinser et Daum 1995).

Informační centrum buňky kvasinek tvoří jako u každé jiné eukaryotické buňky jádro. Je obklopeno dvojitou membránou. Vnější tvoří endoplazmatické retikulum a vnitřní karyolema obklopuje jaderný obsah, nukleoplazmu. Ta představuje chromatin, který se během cytokineze organizuje do chromozomů (Alberts 2005). Součástí jádra je také jadérko. Je místem koncentrace přibližně pětiny RNA celého jádra. U kvasinek má srpkovitý tvar. Je lokalizováno těsně pod karyolemou. Součástí jádra je také pólové tělísko, které představuje organizační centrum mikrotubulů (Kocková-Kratochvílová 1990; Šilhánková 2002).

V cytoplazmě se mohou nalézat i drobné kruhové DNA, tzv. plazmidy, které sice nenesou pro buňku informaci nutnou pro její fyziologické funkce, ale mnohdy jsou příčinou záchrany před jejím zánikem (Bednář et al. 2009). Pro kvasinky je typický 2 $\mu$ m plazmid (Janderová et Bendová 1999).

Velmi významnou buněčnou strukturou je cytoskelet. Cytoskelet kvasinek sestává ze tří typů cytoskeletárních vláken: intermediární filamenta, mikrotubuly a aktinová filamenta. Intermediární filamenta jsou v buňce kvasinek omezena pouze na jadernou laminu, která je mechanickou oporou pro jádro. Nejvíce jsou zastoupena aktinová filamenta, která umožňují buňce kvasinek adherovat k různým povrchům a samozřejmě také pučení. Mikrotubuly jsou zastoupeny jako v kterékoli jiné eukaryotické buňce. Umožňují především mitózu a podél nich se uskutečňuje transport organel či různých substrátů. Podle těchto rozdílných funkcí lze rozdělit mikrotubuly na cytoplazmatické a jaderné (Alberts 2005; David 2007).

Buňku kvasinek obklopuje pevná, pružná buněčná stěna. Barví se pozitivně dle Grama. Buněčná stěna některých basidiomycetárních kvasinek je schopna na svém povrchu

ještě vytvářet polysacharidové pouzdro (např. *Cryptococcus neoformans*). Tato pouzdra jsou přímým nástrojem patogenity, neboť chrání buňku před fagocytózou (Bednář et al. 2009).

Buněčná stěna obsahuje velké množství pórů umožňující průchod různých substrátů, ale jen do určité velikosti. Vysokomolekulární látky, například polysacharidy a bílkoviny, však těmito póry neprojdou (Alberts 2005).

Buněčná stěna velmi účinně odolává mechanickému poškození či změnám osmotického tlaku, což by vedlo k zániku buňky. Zvýšení osmotického tlaku prostředí vede ke kolapsu buňky - plazmolýze a snížení osmotického tlaku prostředí k její ruptuře, plazmoptýze (Kubišta 1998).

Hlavní složkou buněčné stěny kvasinek jsou polysacharidy chitin a  $\beta$ -glukan (Kocmanová et al. 2007). Ty ve formě vláken tvoří pevnou síť (retikulum). Polysacharidová síť je doplněna vmezeřenými proteiny  $\alpha$ -glukanem a manoproteiny. Poměr mezi bílkovinnou a polysacharidovou složkou v buněčné stěně kvasinek je přibližně 1:8. Kupříkladu *C. albicans* má buněčnou stěnu tvořenou z 30-60 % glukany, 25-50 % chitinem, 2-14 % lipidy a z 5-15 % proteiny ([gsbs.utmb.edu/microbook/intomyco.htm](http://gsbs.utmb.edu/microbook/intomyco.htm)).

Buněčná stěna je u kandid stejně jako u ostatních askomycetárních kvasinek tvořena chitinem a  $\beta$ -glukany, v různé míře jsou zastoupeny galaktomannany (především  $\beta$ -mannan),  $\alpha$ -glukan a glukosaminy (Zinser et Daum 1995; Váňa et Kalina 2005; Kocková-Kratochvílová 1982).

Chitin se však u zástupců třídy Schizosaccharomycetes vyskytuje v buněčné stěně jen ve stopovém množství. Převažujícími složkami jsou zde galaktomannany, glukózoaminoglykan a jiné polysacharidy (Kalina et Váňa 2005).

V buněčné stěně basidiomycetárních kvasinek dominuje chitin, přičemž ostatní uhlovodíkové složky jsou zastoupeny v nepatrné míře. Přítomen je  $\beta$ -glukan,  $\alpha$ -glukan a různé xylomannoproteiny, především xylomannan (Kalina et Váňa 2005).

Imunitní odpověď makroorganismu na kvasinkovou infekci je vyvolána právě mannany, případně i dalšími glykoproteiny obsaženými v jejich buněčné stěně ([gsbs.utmb.edu/microbook/intomyco.htm](http://gsbs.utmb.edu/microbook/intomyco.htm)).

## 1.1.2 Metabolismus kvasinek

Neexistuje žádná striktně anaerobní kvasinka. Askomycetární kvasinky včetně schizosaccharomycet jsou fakultativně anaerobní, avšak stopové množství kyslíku je nezbytné pro syntézu komponent jejich cytoplazmatických membrán jako je ergosterol, některé

nenasycené mastné kyseliny či kyselina nikotinová. Mají enzym alkoholdehydrogenázu a lze je nazvat kvasinkami fermentativními. Tyto kvasinky jsou schopny fermentace i v aerobním prostředí. Basidiomycetární kvasinky jsou obligátně aerobní a fermentace nejsou schopny z důvodu absence alkoholdehydrogenázy (Janderová et Bendová 1999).

Jako u všech hub je i u kvasinek typická dráha biosyntézy aminokyseliny lysin přes kyselinu  $\alpha$ -aminoadipovou, tedy dráha AAA. Je to jedinečný evoluční fenomén typický pro říši Fungi. Všechny houby pro správný chod všech metabolických procesů potřebují vodu, vhodnou teplotu, pH, zdroj uhlíku a dusíku, určité anorganické ionty a některé druhy ve velmi malých koncentracích také růstové faktory organického původu. Kvasinky mezi nimi netvoří výjimku (Xu et al. 2006).

Biochemický metabolismus kvasinek sestává z katabolismu a anabolismu. Při katabolických dějích se energie uvolňuje při degradaci různých substrátů a vzniká ATP. Dochází k redukci  $\text{NAD}^+$  na  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$  ( $\text{NADPH}$ ) a ( $\text{FAD}$ ) na  $\text{FADH}_2$ . Tyto vysokoenergetické molekulové nosiče pak dodávají energii anabolickým procesům (Voet 2011).

Mezi katabolické procesy patří například fermentace. Fermentace u kvasinek je metabolický proces, kde je sacharid anaerobní cestou degradován na energeticky chudší alkohol a oxid uhličitý (Voet 2011). Při okysličení substrátu dochází k tzv. Pasteurově efektu, kdy se fermentace výrazně zpomalí a naopak se zrychlí množení kvasinek. Je tedy zřejmé, že aerobní metabolismus je mnohem účinnější než nouzový metabolismus anaerobní (Hugo et al. 2009).

Při anabolických dějích je energie z katabolismu spotřebovávána na syntézu komplexních molekul a jejich meziproductů. ATP je rozkládán na  $\text{ADP}+\text{P}$ . V anabolismu jsou používány redukované formy  $\text{NADPH}$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$ . Tato reakce je katalyzována dehydrogenázami. Mezi anabolické procesy patří např. asimilace (Voet 2011).

Buňka kvasinek obsahuje asi 80 % vody, a proto potřebuje její stálý přísun. Ve vodě jsou rozpuštěny všechny látky důležité pro její výživu. Bez ní by se do buňky nemohly dostat (Kubišta 1998).

Kvasinky mohou růst v rozmezí teplot  $-2-48\text{ }^\circ\text{C}$ , avšak netýká se to všech druhů. Podle teplotních nároků lze kvasinky dělit na kvasinky psychrofilní, mezofilní a termotolerantní. Termovalence psychrofilních kvasinek je  $-2-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Mezi ně patří některé druhy kryptokoků. Teplotní rozmezí pro růst mezofilních kvasinek, je  $2-48\text{ }^\circ\text{C}$ , přičemž v laboratorních podmínkách je běžně užíváno kultivačních teplot  $25-30\text{ }^\circ\text{C}$ , což je růstové

optimum naprosté většiny kvasinek. Termotolerantní kvasinky s růstovým optimem 30-48 °C patří většinou k patogenům homoiotermních živočichů jako například rody *Candida* či *Geotrichum* (Šilhánková 2002).

Kvasinky pro správný růst vyžadují poměrně úzké rozmezí pH, které se pohybuje v mírně kyselém spektru pH = 4,2-5,5. Již lehce zásadité pH = 7,5 zastavuje růst buněk kvasinek. Kvasinky si však mohou díky své biochemické aktivitě pH rychle upravit samy především asimilací (Kocková-Kratochvílová 1982).

Stejně jako všechny houby jsou i kvasinky organismy heterotrofní. Jako zdroj uhlíku tedy využívají organické látky, především šestiuhlíkaté monosacharidy a disacharidy. Některé kmeny *Saccharomyces cerevisiae* zkvašují také trisacharidy. Četní zástupci rodu *Candida* využívají jako zdroj uhlíku také víceuhlíkaté sloučeniny, např. devítiuhlíkaté. energii získávají oxidací těchto organických látek. Jsou schopny biosyntézy všech aminokyselin (<http://isb-up.cz/data/PDF/HBIO/HBIO02.pdf>).

Jejich metabolismus je aerobně respirační. Všechny kvasinky mají schopnost asimilovat sacharidy. Asimilace je utilizace uhlíkatých látek v prostředí s kyslíkem, kdy kvasinky tyto látky osmoticky získávají a přeměňují je na látky jejich buňkám vlastní (Voet 2011; Kocková-Kratochvílová 1982).

Askomycetární kvasinky mají navíc možnost alternativně přejít do nouzového metabolismu anaerobního, který představuje fermentace (Kalina et Váňa 2005). Fermentace sacharidů vyžaduje produkci specifických enzymů jako je alkoholdehydrogenáza nebo pyruvátdekarboxyláza a samozřejmě také enzymy transportního systému pro přenos sacharidu přes cytoplazmatickou membránu v prostředí bez kyslíku (Wellhoener et Geiger 2003). Vlivem redukce velikosti a počtu mitochondrií se silně zpomalí produkce ATP, nicméně buňka přežije (Kaprálek 1999).

Kvasinky přijímají sloučeniny obsahující dusík v anorganické formě jako amoniové soli nebo v organické formě (aminokyseliny). Z amoniových solí slouží jako zdroj uhlíku kvasinkám  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dále například  $\text{NH}_3$  (<http://isbup.cz/data/PDF/HBIO/HBIO02.pdf>).

Amoniak je kvasinkami oxidován na dusičnany, dále pomocí nitrátreduktázy na dusitany a dále pomocí nitritreduktázy na amonný kation. Z aminokyselin slouží jako zdroje dusíku pro kvasinky především kyselina glutamová a asparagin. Dalším významným zdrojem dusíku je močovina. Ta je využívána především basidiomycetárními kvasinkami, protože k její degradaci je nutný enzym ureáza, který močovinu štěpí na oxid uhličitý a amoniak.

Kvasinky využívající jako zdroj dusíku močovinu tedy nazýváme ureáza-pozitivní. Za zdroj dusíku slouží kvasinkám aminokyseliny (Rosa et Péter 2006).

Anorganické ionty nezbytné pro správný růst a vývoj kvasinek jsou především ionty fosforu a hořčíku. Fosfor je nezbytný k zajištění přenosu energie v makroergních vazbách ATP. Jeho deficit vede ke zpomalení růstu kvasinek a ke zpomalení jejich asimilačních a v nepatrné míře i fermentačních procesů. Hořčík stimuluje katalytické procesy a podporuje aktivitu fosfatáz. Dále jsou ve stopovém množství pro kvasinky důležité ionty vápníku, železa, mědi, molybdenu, draslíku, boru, jódu, kobaltu, chloru, zinku či niklu, který je součástí enzymu ureázy (Kocková-Kratochvílová 1982).

Mezi růstové faktory využívané kvasinkami patří vitaminy především z řady B, aminokyseliny, vyšší nasycené mastné kyseliny, aminy či zásadité látky obsahující purinovou a pyrimidinovou bázi (Kocková-Kratochvílová 1982). Pokud si růstové faktory kvasinky neumí syntetizovat samy, je jejich existence závislá na přítomnosti těchto látek v prostředí a jsou nazývány auxotrofními (Kalina et Váňa 2005).

### 1.1.3 Reprodukce kvasinek

Kvasinky se množí dvojím způsobem, a to asexuálně (vegetativně) a sexuálně (generativně). Oba způsoby reprodukce mají různé odchylky na základě taxonomie kvasinkových organismů. Anamorfní stádia jsou omezena pouze na vegetativní způsob rozmnožování. Teleomorfní stádia se mohou rozmnožovat oběma způsoby. Výrazně se liší reprodukce u askomycetárních a basidiomycetárních kvasinek (Kalina et Váňa 2005).

**Vegetativní rozmnožování** pravých kvasinek se děje pučením mateřské buňky. Jedná se o nerovnocenné dělení. Malá dceřiná buňka tzv. zárodečný pupen po skončení mitózy musí dorůst velikosti mateřské buňky, aby se pak sama mohla stát mateřskou buňkou. V buněčném cyklu má velmi dlouhou G1 fázi (Janderová et Bendová 1999). Po této fázi se od ní může a nemusí oddělit. Pokud se oddělí, zanechává v místě odškrcení na mateřské buňce jizvu. Naproti tomu v místě odškrcení na dceřiné buňce zůstává po odškrcení tzv. jizva zrodu (Jeřábková 2006). Např. u rodu *Saccharomyces* se podle počtu jizev dá určit stáří buňky, neboť nepučí ze stejného místa nové buňky vícekrát. Některé kvasinky však pučí bipolárně a u nich jsou pod elektronovým mikroskopem na obou pólech patrné opakované vyvýšeniny (Šilhánková 2002).



Neoddělí-li se však dceřiná buňka od mateřské, stává se zanedlouho i ona buňkou mateřskou a vzniklé větvené řetízky těchto buněk, tzv. blastospor, se rozrůstají v pseudomycelium (Kocková-Kratochvílová 1990).

U některých druhů, např. *Trichosporon* či *Geotrichum*, je typická tvorba také pravého mycelia, kde dochází k příčnému dělení dvou či vícejaderných buněk za tvorby sept. V septech jsou drobné póry jimiž proudí cytoplazma. Při vegetativním rozmnožování pak dojde k rozpadu mycelia v místě sept na jednotlivé buňky zvané arthrospory. Tento typ reprodukce se nazývá vegetativně fruktifikační (Kocková-Kratochvílová 1990).

U schizosacharomycet se vegetativní rozmnožování děje schizotomickým rozpadem mateřské buňky ve 4-8 arthrospor. Jedná se tedy o rovnocenné dělení (Janderová et Bendová 1999; Kalina et Váňa 2005).

Zásadní rozdíl mezi pučením askomycetárních a basidiomycetárních kvasinek je v tom, že jádro basidiomycetárních kvasinek je přesunuto do vznikajícího pupenu ještě před mitotickým dělením, kde také dochází ke karyokinezi. Dělicí vřeténko se rovněž formuje v pupenu. Na konci telofáze se jeden duplikát jádra vrací zpět do mateřské buňky (Kopecká et al. 2001b). U askomycetárních kvasinek dochází k mitotickému dělení v mateřské buňce, kde také vzniká dělicí vřeténko, a duplikát jádra se přesunuje do pupenu až na samém konci telofáze (Winsor et Schiebel 1997).

U pravých kvasinek je **generativní rozmnožování** nejčastěji somatogamické. Jen ojediněle spolu kopulují ne zcela diferencovaná gametangia jako např. u rodů *Endomyces* nebo *Dipodascus*. Při kopulaci dojde ke karyogamii a vzniklá zygota pak obsahuje jediné diploidní jádro. Dochází pak k meióze za vzniku čtyř haploidních jader, která tvoří základ askospor. Ze zygoty vznikají nahá vřečka s endogenně uloženými askosporami. Vřečka jsou prototunikátní. Jejich jediná stěna je velmi tenká, v době zralosti se rozpadá a uvolňuje nejčastěji jednobuněčné askospory. Askospory jsou ve vřecku pravých kvasinek většinou uloženy po čtyřech. Životní cyklus pravých kvasinek je haplobiontní (např. *Dipodascus uninucleatus*), haplodiplobiontní (např. *S. cerevisiae*) s většinou izomorfickou rodozměnou či diplobiontní (např. *Saccharomyces ludwigii*) (Šilhánková 2002; Kalina et Váňa 2005).

Sexuální reprodukci se schizosacharomycety od pravých kvasinek jednobuněčného typu výrazně neliší. Jejich prototunikátní vřečka vznikají též po hologamické konjugaci dvou buněk a obsahují čtyři nebo osm askospor u *Schizosaccharomyces octosporus*. Jejich životní cyklus je striktně haplobiontní (Kalina et Váňa 2005).

Teleomorfy basidiomycetárních kvasinek vytvářejí po konjugaci somatických buněk jednotlivé stopkaté, kyjovité holobasidie. Při konjugaci somatických buněk dochází k fúzi jader a následné meióze. Výsledkem meiózy jsou 4 haploidní jádra a ta se pak jednou či vícekrát mitoticky rozdělí. Tato jádra pak migrují z basidie do vznikajících basidiospor. Na basidiích vznikají basidiospory exogenně (Šilhánková 2002; Kalina et Váňa 2005).

Reprodukcí kvasinek lze vyjádřit růstovou křivkou, která je společná všem organismům nalézající se v prostředí s omezeným množstvím živin (viz. Tabulka 1a). Je to vyjádření počtu jedinců v závislosti na čase až do vyčerpání živin. Růst kvasinek vykazuje určitou dynamiku, kterou lze vyjádřit charakteristickými fázemi. Jejich délky se mohou lišit u různých druhů. Lze je změnit i odlišným způsobem kultivace. Tyto růstové fáze jsou na křivce zřejmé jako její úseky (Kocková-Kratochvílová 1982; Šilhánková 2002).

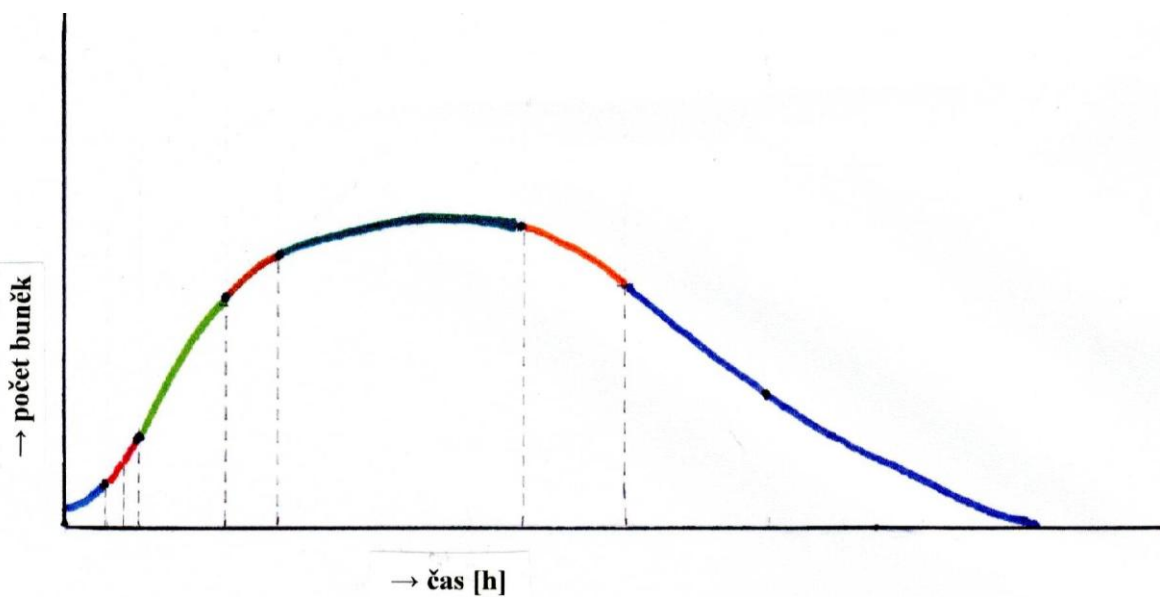
**Lag-fáze** je vyjádření inokulace. Buňky se nemnoží, jen se adaptují na nové prostředí. Aktivují svůj enzymový aparát a rostou. Nejkratší je tato fáze, jsou-li buňky kvasinek odebrány z exponenciální fáze, kdy se překotně množí. Množství buněk se víceméně nemění a odumírají jen staré buňky. Kolik jich je zaočkováno, takový počet se projeví na křivce. **Fáze začínajícího růstu** nastává po adaptaci buněk na prostředí. Dělí se na dvě části. V *počáteční fázi* buňky načerpávají energii, začínají využívat živiny, prodlužují se a stále zvětšují svůj objem. V *akcelerační fázi* pak zakládají zárodečné pupeny, které se oddělují od mateřských buněk. Na konci této fáze lze napočítat až 100 % pučících buněk. V **exponenciální (logaritmické) fázi** se buňky množí konstantní rychlostí a jejich počet se exponenciálně zvyšuje. Je to fáze, kde buňky maximálně využívají živiny z prostředí. Počet zárodečných pupenů, které se vytvořily v akcelerační fázi a v první polovině exponenciální fáze se v druhé polovině této fáze odškrcují do prostředí a počet pučících buněk se snižuje až k nule. Na konci exponenciální fáze téměř všechny buňky žijí. Poté nastává **fáze zpomaleného růstu**. Začínají se hromadit sekundární metabolity a toxické odpadní látky například ethanol z fermentačního procesu. Snižuje se intenzita metabolismu kvasinek, a proto i rychlost množení. Zvyšuje se počet odumírajících buněk. Buňky raně vzniklé zvětšují svůj objem, aby se v následující fázi vyrovnaly velikosti buněk mateřských. Ve **stacionární fázi** je vyrovnán úbytek a přírůstek jednotlivých organismů. Množství přeživších buněk je závislé na rezistenci k nedostatku živin, toleranci k toxinům a rychlosti metabolické adaptace k nízkému množství živin. U některých druhů se vytváří endospory či chlamydospory, které slouží k přečkání nutriční krize. Tyto struktury využívají energii jen minimálně narozdíl od vitálních buněk.

Dříve či později nastane **fáze odumírání**, kdy počet odumírajících buněk začne stále více převyšovat počet nově vzniklých buněk, až dojde k úplnému zániku celé kultury. Tuto fázi lze rozdělit na *fázi zrychleného odumírání* a následnou *logaritmickou fázi* (Tvrdoň et Bálešová 1986, Němec et Horáková 1999).

Existují tři způsoby kultivace mikroorganismů, jimiž lze významně změnit průběh růstové křivky.

**Statická** je kultivace s konstantním množstvím živin v klidové poloze. Dostupnost živin je tedy omezená, přestože v médiu jich je dostatek. Fáze růstové křivky jsou proto značně časově zkrácené. **Submerzní** kultivace je založena na stálém promíchávání média, které obsahuje rovněž omezené množství živin, ale jejich dostupnost je díky neustálému rozptylu maximální. **Kontinuální** kultivace se od předchozích dvou výrazně liší. Živiny jsou zde doplňovány opětovným průtokem. Toxické sekundární metabolity a odumřelé buňky jsou naopak odváděny. Kultura mikroorganismů se touto kultivací může udržovat donekonečna a růstová křivka bude stále exponenciálně růst (Janderová et Bendová 1999).

**Schéma 1a.**: Růstová křivka mikroorganismů v prostředí s omezeným množstvím živin



- 1. Lag-fáze
- 2a. Počáteční fáze začínajícího růstu
- 2b. Akcelerační fáze
- 3. Exponenciální fáze
- 4. Fáze zpomaleného růstu
- 5. Stacionární fáze
- 6a. Fáze zrychleného odumírání
- 6b. Logaritmická fáze odumírání

## **1.2 VÝZNAM KVASINEK V MEDICÍNĚ**

### **1.2.1 Charakteristika kandidóz**

Kandidy jsou přítomné v nejrůznějším materiálu jako je například ovoce, mléko, či půdní substrát. Vyskytují se rovněž jako komenzálové u zdravých savců včetně člověka na kůži, ústní, střevní či genitální sliznici (Fragner 1984). Žijí tam se specifickými druhy bakterií v určité ekologické rovnováze. Pokud je tato rovnováha nějakým způsobem narušována ve prospěch kvasinek, může dojít k endogenní infekci. Z toho důvodu se jedná o oportunní patogeny (Bednář et al. 2009).

Onemocnění vyvolaná kvasinkami rodu *Candida* jsou označována jako kandidózy. Začínají invazí patogena do tkáně (Bednář et al. 2009). Nejvýznamnější patogenní zástupce představují *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, vzácněji také u *C. kefyr*, *C. fabianii*, *C. pelliculosa*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* a *C. stellatoidea* (Fragner 1992). V popředí stojí *C. albicans*, která je coby původce kandidóz prokazatelně nejběžnější. Ostatní patogeny jsou pak označovány jako kandidy „non-*albicans*“ (Maartens et Wood 1991).

Kandidy způsobují povrchové i hluboké infekce. Povrchové infekce se manifestují na kůži, kožních adnexech či sliznici. Častou příčinou lokálních kandidóz je narušení bakteriální flóry. Postižena je nejčastěji sliznice genitálu a úst. Hluboké infekce se projevují jako systémová onemocnění. Dochází při nich k diseminaci kvasinek krevní cestou za vzniku celkové sepse. Predisponovanými pacienty jsou jedinci s dlouhodobým imunodeficitem. Vstupní branou infekce může být otevřená rána či narušená střevní sliznice (Bednář et al. 2009).

Některé druhy kandid vytvářející pravé mycelium, především *C. parapsilosis*, ale i *C. albicans*, velmi ochotně lnou k hladkým povrchům jako jsou kanyly, protézy, umělé srdeční chlopně či kloubní náhrady, které mohou porůstat za tvorby biofilmu (Fragner 1992). Druhy vytvářející hyfy a pseudohyfy mohou prorůstat i do okolních tkání. Krevní plazma i lymfa jsou pro kvasinky velmi vhodné médium a lidská tělesná teplota vnitřního prostředí 37 °C rovněž představuje hodnotu v rozmezí jejich růstové tolerance (Otčenášek et al 1990; Janderová et Bendová 1999). Přítomnost kandid v krvi je označována jako kandidémie (Hugo et al. 2009).

V minulosti byli kvasinkovou infekcí nejvíce ohroženi pacienti nakaženi virem HIV. Díky vysoce agresivní léčbě, blokující opětovnou infekci vnímavých buněk k tomuto viru, se

procento ohrožených pacientů výrazně snížilo. K rizikové skupině dnes patří hlavně hematoonkologičtí pacienti po transplantaci kostní dřeně, kterým jsou dlouhodobě podávána imunosupresiva, pacienti s diabetes mellitus při dlouhodobě vysokých glykemických hodnotách či pacienti na popáleninových centrech, kteří mají rozsáhlé destrukce kůže představující širokou vstupní bránu především pro nozokomiální kvasinkové infekce (Fučíková et Bartůňková 1994; Jedličková 2006).

## 1.2.2 Popis studovaných druhů kvasinek

### *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923

Vyskytuje se pouze v imperfektním stádiu. Teleomorfa dosud nebyla zjištěna (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

V přírodě je *C. albicans* vzácná. Je nalézána v půdě sekundárně kontaminovanou stolicí savců, kde může přežívat díky tvorbě chlamydospor (Fragner 1992). Jako komenzál savců včetně člověka je ze všech kvasinek nejběžnější. Na kůži je nalézána jen náhodně. Spolu s přirozenou bakteriální flórou osidluje ústní sliznici a jazyk, tonzily, střevní sliznici, vaginální sliznici či zevní zvukod. U 10-20 % zdravých lidí je izolována z moči, sputa či stolice v množství  $10^2$ - $10^3$  buněk/ml (Janderová et Bendová 1999).

*C. albicans* jako patogenní agens člověka je z kandid nejčastější. Uplatňuje se jako patogen v 70-90 % případů kandidóz (Janderová et Bendová 1999). Je původcem lokálních kandidóz kůže, především v intertriginózních oblastech, paronychii, odkud se distálně šíří do nehtové ploténky, kde vyvolává onychomykózy (Bednář et al. 2009). Vzácnější je tvorba tzv. kerionu, infekční hyperkeratózy ve kštici, dále pak kožní granulomy, folliculitis barbae, kandidózy rtu a periorální pustulózní erupce (Fragner 1992). Běžnější jsou touto kvasinkou vyvolané slizniční pseudomembranózní kandidózy jazyka a orální sliznice tzv. „soor“ (viz. **Obrázek 13.**), také kandidózy genitálu. Ze systémových infekcí je původcem endoftalmitid, infekcí žlučníku, vzácně i plic (viz. **Obrázek 16.**), peritonitid, endokarditid, meningitid a následných generalizovaných sepsí, tzv. kandidémií (viz. **Obrázek 17.**) (Fragner 1984).

Na Sabouraudově glukózovém agaru (SGA) při teplotě 30 °C po 48 h vytváří 2-5 mm v průměru velké, nejčastěji okrouhlé, bělavé až lehce krémové polokulovité, hladké a lesklé kolonie, které mají vždy mazlavou konzistenci (viz. **Obrázek 3.c**). Okraj kolonií je kruhový, víceméně pravidelný, nevláknitý, u některých kmenů vnořený do agaru. *C. albicans* má charakteristickou moučně ovocnou vůni (Fragner 1992).

Mikroskopicky lze u kmenů z klinického materiálu pozorovat nejčastěji kulovité až krátce elipsoidní pučící buňky tzv. blastospor 3-5  $\mu\text{m}$  v průměru. Buňky pseudomycelia a mycelia však mohou být až 30  $\mu\text{m}$  dlouhé (Fragner 1992). *C. albicans* je typická tvorbou zárodečných klíčků, tzv. germ tubes. Díky jejich prorůstání z fagozómu mohou buňky *C. albicans* unikat imunitní odpovědi hostitele (Bednář et al. 2009).

Za nepříznivých podmínek vznikají na hyfách terminálně, interkalárně či laterálně kulaté, světlolomné, silnostěnné, a tudíž k vnějším vlivům velmi rezistentní, buňky zvané chlamydospor (viz **Obrázek 3.a**). Jsou 7-10  $\mu\text{m}$  velké (Otčenášek et al. 1990). U jiných druhů, kromě *C. dubliniensis*, nebyla tvorba chlamydospor zjištěna. Tyto nepříznivé podmínky lze v laboratoři simulovat kultivací *C. albicans* například na rýžovém agaru (RA) či na kukuřičném agaru (CMA), dříve i na žlučovém agaru s taurocholátem (TCA) (Koukalová et al. 2011).

Mezi biochemické vlastnosti *C. albicans* patří schopnost fermentace glukózy, maltózy, galaktózy, s určitým zpožděním i trehalózy a také neschopnost fermentace sacharózy a laktózy. Asimilovat nedokáže ze jmenovaných sacharidů pouze laktózu (Fragner 1992; [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au)).

### **Candida tropicalis** (Castellani) Berkhout 1923

Rovněž u této kvasinky nebylo zjištěno perfektní askosporové stádium (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

V přírodě je poměrně častá. Její výskyt je zaznamenán z půdy a vody kontaminované hovězím trusem, dále z ovoce a to i hnilivého, tlejícího dřeva, lisovaných kvasnic, kyselého zelí či acidofilního mléka. Přirozeně osidluje u člověka stejná místa jako *C. albicans* (Fragner 1992).

Jako oportunní patogen může vyvolávat kožní kandidózy, paronychia s následnou onychomykózou a slizniční vulvovaginální infekce (Fragner 1984). Vyvolává i systémové kandidózy jako peritonitidy, endokarditidy, perikarditidy, infekce oka (viz. **Obrázek 15.**) i generalizované sepse (Haber 1995).

Na SGA po 48 h vytváří při 30 °C bělavé až krémové polokulovité, hladké a lesklé, někdy polomatné kolonie 3-5 mm v průměru (viz. **Obrázek 12.c**). Okraj kolonií je pravidelný, nevláknitý nebo je vláknitý velmi krátce. *C. tropicalis* je cítit po ovoci, ale některé kmeny mají výrazný pach po uvařené kapustě či kvěťáku (Fragner 1992).

Mikroskopicky jsou patrné sférické, krátce či dlouze elipsoidní či ovoidní blastosporý o rozměru 3-10 x 2-6,5 µm. Buňky mycelia a pseudomycelia jsou až 20 µm dlouhé (viz **Obrázek 12.a**). V koloniích s hladkým povrchem je tvorba pseudomycelia a pravého mycelia redukována (Fragner 1992).

Z biochemických vlastností lze jmenovat schopnost fermentace a asimilace glukózy, sacharózy, maltózy a galaktózy. Nedokáže fermentovat ani asimilovat laktózu (Koukalová et al. 2011; [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au)).

### **Candida glabrata** (H.W. Anderson) S.A. Mey. & Yarrow 1978

Ani u *C. glabrata* doposud nebylo popsáno teleomorfní stádium (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

V přírodě se vyskytuje poměrně hojně v citrusech či pekařském droždí. U člověka patří k běžné střevní i vaginální flóře. Osidluje v malé míře i ústní sliznici, jícen a zevní zvukovody. Jako oportunní patogen může vyvolat kolpity (Fragner 1992). Asi 10 % kmenů vykazuje rezistenci vůči flukonazolu (Jedličková 2006).

Na SGA tvoří po 48h při 30 °C nejčastěji 2-5 mm v průměru velké kolonie bělavě krémové barvy (viz. **Obrázek 5.c**). Jsou poměrně nízké, mírně kopečkovitě vyvýšené nebo téměř polokulovitě vyklenuté, hladké a velmi lesklé. Okraj kolonií není vláknitý, je pravidelný, zřídka slabě laločnatý. Vůně je ovocná (Fragner 1992).

Blastosporý *C. glabrata* jsou sférické, ovoidní či elipsoidní, ať už dlouze či krátce, 1,5-4,5 x 2-8 µm velké (viz. **Obrázek 5.a**). Pro jednotlivé kmeny je typický víceméně jeden tvar buněk. Pučení je multipolární. Mycelium ani pseudomycelium není nikdy vytvořeno (Fragner 1992).

Mezi biochemické vlastnosti *C. glabrata* patří schopnost fermentovat glukózu, ale nikoli už laktózu, maltózu a galaktózu. Asimiluje trehalózu a glukózu, ale ne laktózu, galaktózu, maltózu, rafinózu, D-xylózu, erythritol a inositol (Fragner 1992; Koukalová et al. 2011; [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au)).

### **Candida krusei** (Castellani.) Berkhout 1923

Teleomorfa *C. krusei* je askomycetární kvasinka *Issatchenkia orientalis* (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

V přírodě se přirozeně vyskytuje ve vzduchu, kvasnicích, ovoci jako například datle či hroznové víno. Je původcem křísu vína i piva. U člověka přirozeně osidluje ústní a střevní

sliznici. Lokálně se může vzácně uplatnit jako patogenní agens při vaginálních infekcích, systémově pak při vředu rohovky, peritonitidě i celkové sepsi (Fragner 1992). Je známa svou rezistencí vůči flukonazolu (Jedličková 2006).

Na SGA tvoří po 48 h při 30 °C 2-4 mm v průměru velké matné (viz. **Obrázek 8.c**), polomatné či lesklé kolonie krémové barvy s výrazným středem. Okraj kolonií je nevláknitý nebo jen krátce vláknitý. Některé kmeny mají příjemnou až ostrou ovocnou či esterovou vůni, jiné kmeny zase velmi nepříjemně kysele zatuchle páchnou (Fragner 1992).

Kolonie tvoří převážně dlouze elipsoidní, 2-8 x 3-60 µm velké buňky, jen v malém množství lze najít i ovoidní, krátce elipsoidní či kulovité blastospory (viz. **Obrázek 8.a**). Pseudomycelium je bohatě vyvinuto ve vláknitých koloniích, avšak u hladkých je dosti lámavé a nedokonale vyvinuté (Fragner 1992).

Biochemická aktivita *C. krusei* je typická svou neschopností fermentace i asimilace sacharózy, laktózy, maltózy či galaktózy, zatímco fermentovat a asimilovat dokáže většinou jen glukózu (Koukalová et al. 2011; [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au)).

### **Candida parapsilosis** (Ashford) Langeron & Talice 1932

*Také u C. parapsilosis* nebylo teleomorfní stádium ještě zatím popsáno (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

V přírodě osidluje vodu, mízotoky dubu a střevní sliznici prasat či koní. U člověka se běžně vyskytuje na kůži, ústní a střevní sliznici. Má schopnost lnout k hladkým povrchům, a tedy porůstá často zubní náhrady, kanyly nebo cévní a močové katétry. Bývá proto častou příčinou katéetrových kandidémií. Dále způsobuje paronychie, onychomykózy a otomykózy (viz. **Obrázek 14**). Ojedinelý je výskyt kožních projevů jako např. folliculitis barbae (Votava 2003). Nozokomiální systémové infekce jako jsou endoftalmitidy, endokarditidy či peritonitidy způsobené touto kvasinkou jsou při přísné sterilizaci operačních nástrojů vzácné (Fragner 1992).

Na SGA vytváří až po 72 h při 30 °C 3-6 mm velké, jasně bílé nebo bělavě krémové kolonie (viz **Obrázek 10.b**). Jsou vyvýšené, s pravidelným okrajem až krajkovitě laločnatým. Kolonie některých kmenů mají velmi ozdobný tvar. V jedné kultuře může být patrný po pěti a více dnech i přechod. Kruhové kolonie mají hladký a lesklý povrch. Kultury mají nasládlou lehce ovocnou vůni (Fragner 1992).

Blastospory jsou sférické, polokulovité, široce či dlouze elipsoidní i ovoidní 2-6 x 2-10 µm velké (viz. **Obrázek 10.a**). Na bohatě vytvořeném pseudomyceliu někdy



vznikají sférické či cylindrické obří buňky, které však, narozdíl od chlamydospor, typických pro *C. albicans*, nejsou silnostěnné (Fragner 1992).

*C. parapsilosis* je schopna fermentovat glukózu a galaktózu. Nefermentuje laktózu maltózu a sacharózu. Kromě laktózy asimiluje všechny čtyři jmenované sacharidy (Koukalová et al. 2011; [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au)).

### **Candida kefyr** (Beijerinck) van Uden & H.R. Buckley 1970

Teleomorfa *C. kefyr* je askomycetární kvasinka *Kluyveromyces marxianus* (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

Dovede fermentovat třtinový cukr na etanol. V přírodě se vyskytuje v droždí, acidofilním mléku, kde tvoří zrna, jogurtech, sýrech a jiných mléčných výrobcích. U člověka osidluje orální sliznici, tonzily, střevní i anální sliznici. Jako významný patogen se uplatňuje při kolpitidách, endoftalmitidách i lehčích zánětech oka, při meningitidách i generalizovaných smrtelných sepsích (Fragner 1992).

Po 48 h při 30 °C na SGA vytváří *C. kefyr* 3-5 mm v průměru velké bělavé, žlutavé, šedavé či okrové kolonie, které mají často tmavší střed (viz. **Obrázek 7.b**). Povrch je víceméně polokulovitě vyvýšený či kopečkovitý, někdy hladký a lesklý, pololesklý, jindy rozpraskaný. Okraj kolonie je řidší a průsvitný, někdy kruhovitý, jindy nepravidelně laločnatý či vroubkovaný. Je nevláknitý, někdy vmáčkklý do agaru. Všechny známé kmeny mají ovocnou vůni (Fragner 1992).

Blastospory *C. kefyr* jsou sférické či hemisférické, ovoidní či elipsoidní až dlouze elipsoidní, 2-7 x 3-12 µm velké (viz. **Obrázek 7.a**). U některých kmenů se mycelium ani pseudomycelium nevytváří, u jiných je naopak silně vyvinuto. Je složeno z dlouze elipsoidních nebo cylindrických buněk 2-8 x 3-16 µm velkých. Teleomorfa se vytváří při kultivaci na agaru podle Gorodkové (GA), „yeast morphology“ agaru (YMA), či V-8 juice agaru (JA). Nese nejčastěji protáhlá vřečka s 1-4člunkovitými, vzácně elipsoidními či alantoidními askosporami (Otčenášek et al. 1990.; Fragner 1992).

*C. kefyr* fermentuje a asimiluje glukózu, sacharózu, galaktózu a laktózu, není však schopna fermentace ani asimilace maltózy. (Koukalová et al. 2011; [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au)).

### *Candida lusitaniae* Uden & Carmo Souza 1959

Teleomorfa k tomuto anamorfnímu druhu je askomycetární kvasinka *Clavispora lusitaniae* (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

V přírodě je *C. lusitaniae* nalézána v kukuřičné mouce a citrusové šťávě. Běžně též kolonizuje trávicí trakt hospodářských zvířat. I u člověka je někdy nalézána jako běžná flóra tlustého střeva, ale i sliznice úst. Jako patogen se uplatňuje při infekcích močových cest i celkové sepsi. Z lokálních infekcí bývá někdy původcem paronychií a onychomykóz (Fragner 1992).

Na SGA za 48 h při 30 °C vytváří 2-6 mm velké bělavé či krémové kolonie (viz. **Obrázek 9.b**). Někdy jsou kopečkovitě vyvýšené, jindy zanořené do agaru. Jejich okraj je pravidelný, laločnatý, někdy vroubkovaný. Povrch kolonie je u některých kmenů lesklý, u jiných zase matný. Střed kolonie je někdy vyvýšený, jindy promáčklý až kráterovitý. Kolonie některých kmenů mají ovocnou vůni, kolonie jiných zase páchnou po svítiplynu (Fragner 1992).

Pod mikroskopem jsou zjevné sférické, cylindrické, ovoidní, elipsoidní až dlouze elipsoidní buňky 2-9 x 1,5-5 µm. Často se však tvarem a velikostí liší i v rámci jednoho kmene (viz. **Obrázek 9.a**). Některé kmeny tvoří mycelium a pseudomycelium jen v náznacích, u jiných je zase bohatě vyvinuto z buněk až 18 µm dlouhých (Fragner 1992).

Ochotně fermentuje glukózu, se zpožděním i trehalózu, neumí fermentovat laktózu. Asimiluje glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu, xylózu, trehalózu, rhamnózu či melezitózu. Není však schopna asimilace laktózy, rafinózy, erythritolu a inositolu (Fragner 1992; Koukalová et al. 2011; [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au)).

### *Candida fabianii* K. Kodama, Kyono, Iida & Onoyama 1964

Teleomorfa je druh askomycetární kvasinky *Cyberlindnera fabianii* (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

*C. fabianii* je velmi podobná svými morfologickými i biocemickými vlastnostmi druhům *C. utilis* a *C. pelliculosa*. Rozdíl je patrný v počtu G-C párů v DNA (Tyčová 2010).

Je běžná v odpadních vodách, půdě, rýžovém fermentátu vzniklém vlivem metabolických procesů *Aspergillus oryzae*. Byla izolována také z chodbiček brouka *Xylion adustus* (Kurtzman et Fell 1998; Valenza et al. 2006).

U člověka kmeny, které rostou při 37 °C, osidlují střevní, orální i anální sliznici. Jen takové kmeny se mohou uplatnit jako oportunní patogeny způsobující lokálně kolpitidy a při

výraznějším a dlouhodobějším imunodeficitu i kandidémié s celkovou sepsí (Haber 1995). Byla popsána prostatitis a urethritis (Dooley et al. 1990), nekrotizující enterokolitis u novorozence (Bhally et al. 2006), endokarditis (Hamal et al. 2008) a letální septikémié (Valenza et al. 2006).

Na SGA vytváří po 48 h při 30 °C 2-5 mm v průměru velké bělavé až šedavě krémové kolonie (viz. **Obrázek 11.b**). Povrch kolonií je hladký a lesklý až pololesklý. Některé kmeny však vytvářejí kolonie matné, jako by poprášené, zvrásněné. Okraj kolonií je téměř kruhovitý či slabě laločnatý, nevláknitý, nebo jen krátce vláknitý. Některé kmeny jsou cítit výrazně po směsi ovoce a acetonu dlouhodobě, jiné později nepříjemně zatuchle či kysele páchnou (Fragner 1992).

Blastospory *C. fabianii* jsou sférické, ovoidní, široce elipsoidní nebo cylindrické (viz. **Obrázek 11.a**). Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 2-5 µm. V hladkých, lesklých koloniích se mycelium ani pseudomycelium prakticky nevytváří. V matných a zvrásněných koloniích je však mycelium či pseudomycelium bohatě vyvinuto a větveno. Skládá se z buněk až 2 mm dlouhých (Fragner 1992). Při kultivaci na GA, YMA či JA lze někdy nalézt i teleomorfu s kloboukovitými askosporami. Velikost askospor se pohybuje v rozmezí 1-2 x 1,5-2 µm. Jsou uloženy po 1-4 ve vřecku, nejčastěji však po dvou. Každá obsahuje tukovou globuli (Fragner 1992).

*C. fabianii* je schopna asimilovat sacharózu, maltózu, melezitózu nebo trehalózu. Nedokáže však asimilovat laktózu, rhamnózu, melezitózu a narozdíl od *C. pelliculosa* také erythritol. Fermentuje glukózu, sacharózu a maltózu, ne však laktózu, galaktózu a erythritol. Nedokáže růst na médiu bez vitaminů (Tyčová 2010).

### **Candida guilliermondii** (Castellani) Langeron & Guerra 1938

*C. guilliermondii* je anamorfou k teleomorfnímu stádiu askomycetární kvasinky *Meyerozyma guilliermondii* (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

V přírodě je zaznamenán výskyt *C. guilliermondii* ve vzduchu, ve slané vodě, v různém kvasícím materiálu, podmásli či v ochranném slizu mořských ryb a ve stolici savců. U člověka osidluje kůži a vaginální sliznici (Fragner 1992).

Jako patogen se uplatňuje především při kožních a vaginálních infekcích. Systémové infekce *C. guilliermondii* jsou poměrně vzácné. Někdy se podílí spolu s bakteriemi na infekcích oka. U pacienta s apoplastickou anémií byla hlášena generalizovaná kandidémié způsobená touto kvasinkou (Fragner 1992).

Na SGA při 30 °C vytváří 2-4 mm velké kolonie bělavě zbarvené až do krému, lesklé, hladké (viz. **Obrázek 6.c**). Buňky či blastokonidie jsou kulovité či polokulovité, 2-4 x 3-6,5 µm (viz. **Obrázek 6.a**) (Fragner 1984).

Z biochemických vlastností *C. guilliermondii* fermentuje glukózu, sacharózu a některé kmeny i galaktózu, není však schopna fermentace laktózy, maltózy a trehalózy. Asimiluje glukózu, sacharózu, galaktózu, maltózu, trehalózu, D-xylózu, melezitózu, L-rhamnózu. Laktózu, erythritol a inozitol však asimilovat neumí (Fragner 1992; [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au)).

**Candida dubliniensis** D.J. Sullivan, Western., K.A. Haynes, Dés. E. Benn. & D.C. Coleman 1995

Teleomorfní stádium *C. dubliniensis* zatím nebylo popsáno stejně jako u *C. albicans* (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

Svémi fyziologickými a morfologickými vlastnostmi, stejně tak i ekologickými nároky je téměř totožná s *C. albicans* (viz. **Obrázek 4. c**). Liší se však velmi podstatně svou genetickou výbavou ([mikrobewiky.kenyou.edu](http://mikrobewiky.kenyou.edu)).

V přírodě se prakticky nevyskytuje, ale může podobně jako *C. albicans* přežívat v půdě kontaminované savčím trusem v podobě chlamydospor. Může se vyskytovat na ústní i střevní sliznici. Jako původce generalizovaných sepsí byla původně izolována z HIV séropozitivních pacientů ve stádiu AIDS. Příležitostně bývá izolována ze systémových infekcí imunosuprimovaných pacientů (Gilfillan et al. 1998).

*C. dubliniensis* je kosmopolitně rozšířena a byla popsána jako samostatný druh roku 1995. Jedním z testů k odlišení *C. dubliniensis* a *C. albicans* je laboratorní kultivace při teplotě 42 °C. Většina kmenů *C. albicans* při této teplotě ještě roste narozdíl od *C. dubliniensis*, u které dosud nebyl zjištěn ani jediný kmen, jenž by při této teplotě vykazoval nějaký růst (Kamiyama et al. 1989).

Existují rovněž rozdíly v podmínkách a morfologii, v nichž oba druhy tvoří chlamydospory. U *C. dubliniensis* se tvoří na CMA a RA po 72 h. Jsou uspořádány po jedné, ve dvojicích, ale i v řetězcích či shlucích (viz. **Obrázek 4.a**) (Sullivan et al. 1995).

Většina kmenů *C. dubliniensis* narozdíl od *C. albicans* však nedokáže asimilovat D-xylózu ([www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au)). Spolehlivé odlišení těchto dvou druhů je však zatím možné pomocí přímých sérologických metod detekujících rozdílné povrchové antigeny nebo metodami molekulárně biologickými.

## **1.3 DIAGNOSTIKA KVASINKOVÝCH INFEKČÍ**

Odebraný klinický materiál by měl být doručen do mikrobiologické laboratoře obvykle během dvou hodin nebo musí být uložen do chladničky. Přítomnost kvasinek v makroorganismu lze prokázat několika vzájemně se doplňujícími způsoby přímé detekce, a to kultivací, mikroskopií, sérologicky (průkazem antigenů, případně protilátek) a molekulárně genetickými metodami (Kocmanová et al. 2007).

Pro průkazu mykotických infekcí lze odebrat různé druhy klinického materiálu, například hemokulturu, mozkomíšni mok, bronchoalveolární laváž, sputum, moč, stolicí, stěry ze sliznic a kožních lézí (Buchta 2010).

### **1.3.1 Kultivace**

Kultivace kvasinek je základní technikou detekce lokálních i systémových kandidóz. Včetně patogenních druhů jsou kultivačně nenáročné. Nejlépe rostou v teplotním rozmezí 25-37 °C. Typické kolonie se vytváří již po 48-72 h. Kultivace kvasinek probíhá na pevných či tekutých médiích (Otčenášek et al. 1990).

Z pevných půd je základním médiem pro růst kvasinek SGA, k němuž se obvykle přidává širokospektré antibiotikum, chloramfenikol potlačující růst bakteriální mikroflóry (Jedličková 2006).

Přidání sterilního olivového oleje k SGA umožní růst lipofilních kvasinek rodu *Malassezia* (Fragner 1984).

K identifikaci *C. albicans*, respektive *C. dubliniensis* se používá médií chudých na živiny jako např. CMA či RA, kde tyto kvasinky vytvářejí chlamyospory, dříve se užívalo TCA (Otčenášek et al. 1990). Inkubace probíhá 48 h při teplotě 24 °C (Koukalová et al. 2011).

Charakteristickou vlastností *C. dubliniensis* stejně jako *C. albicans* je tvorba zárodečných klíčků, tzv. germ tubes, které vyrůstají z blastospor. Vhodné prostředí pro germinaci představuje hovězí, morčecí, králičí, koňské, ale i lidské krevní sérum, ať již inaktivované, nebo čerstvé. Klíčící vlákna se začínají tvořit na blastosporách už po 3 h od inokulace. (Otčenášek et al. 1990).

Velmi vhodnou pomůckou, která výrazně urychlí izolaci a identifikaci patogenních kvasinek rodu *Candida*, je kultivace na selektivně diagnostických chromogenních médiích. Kvasinky totiž hydrolyzují chromogenní substráty díky své enzymatické výbavě, která je druhově specifická. Příkladem chromogenní půdy je Colorex Candida (CRC); Trios, ČR. Na

CRC nelze odlišit *C. albicans* a *C. dubliniensis*, jejichž kolonie se zbarvují do zelena (viz. **Obrázek 3.b** a **Obrázek 4.b**), kolonie *C. tropicalis* se zbarvují do modra (viz. **Obrázek 12.b**), *C. glabrata* purpurově červeně až do fialova s nápadným leskem (viz. **Obrázek 5.b**) a *C. krusei* rostoucí v podobě růžově červených matných nepravidelných koloniích (viz. **Obrázek 8.b**) (Koukalová et al. 2011).

Vhodná média pro stimulaci tvorby teleomorfy s věčky kvasinek jsou např. GA, YMA či JA. Dříve se používal i mrkvový agar (MA). Tato média obsahují jen malé množství sacharidů, což omezuje vegetativní reprodukci, avšak naopak stimuluje reprodukci generativní (Otčenášek et al. 1990; Fragner 1992; Koukalová et al. 2011).

### 1.3.2 Mikroskopie

Mikroskopie je v mikrobiologii velmi významnou technikou sloužící k rychlé diagnostice. Pomocí mikroskopie navíc lze u některých typů vzorku zjistit, nejedná-li se v nich o kontaminaci (Koukalová et al. 2011).

Mikroskopické vyšetření se v lékařské mykologii používá k průkazu mikroskopických hub v klinickém materiálu nebo jako součást jejich identifikace. Pro přímou detekci se používá nativní nebo fixovaný barvený preparát. V nativním preparátu lze pozorovat živé kvasinky, kdežto v barveném a následně fixovaném preparátu jsou patrné mrtvé struktury.

Některé metody nativních preparátů slouží k diagnostice kandidóz. Pomocí prostého nativního preparátu lze v kapce fyziologického roztoku pozorovat tenkostěnné pučící buňky kvasinek. Dalším příkladem nativního preparátu je louhový preparát, u něhož se místo fyziologického roztoku používá 10% či 20% roztoku KOH nebo NaOH, aby byl klinický materiál bohatý na keratin rozrušen. Používá se při průkazu dermatomykóz, onychomykóz, ale také při pozorování houbových buněk ve vzorcích živé tkáně. Přidáním Parkerova inkoustu, který se váže na chitinová vlákna, k louhovému preparátu je navíc dosaženo výrazně modrého obarvení buněčné stěny (Otčenášek et al. 1990).

Mikroskopickou techniku lze využít i k přesnější identifikaci druhu kvasinky. Nativní preparát s klíčními vlákny *C. dubliniensis* nebo *C. albicans* narostlých po 3 h při 37 °C lze pozorovat suchou cestou. Tlustostěnné chlamydostry těchto druhů kvasinek se mikroskopicky prokazují na nutričně chudých médiích (Koukalová et al. 2011). Metody negativního barvení tuší a se využívá při průkazu *C. neoformans*, kde slizové pouzdro kryptokoka zůstane hyalinní, avšak pozadí je zbarveno tmavě (Janderová et Bendová 1999).

U fluorescenčních metod se v nativním louhovém preparátu používá jen 2% NaOH s přidáním specifických fluorochromů (Blankophor, Rylux BSU). Tyto fluorochromy se pevně vážou na chitin v buněčné stěně, které pak ve fluorescenčním mikroskopu v modrém dopadajícím světle (ve filtru BG 12, KP 490 + B 229, C. Zeiss Jena) přes oranžový bariérový filtr (OG 1, OG 4 či G 247) na tmavém pozadí preparátu září žlutozeleně (Otčenášek et al. 1990).

Z barvených preparátů se nejčastěji používá metoda podle Grama sloužící nejčastěji k průkazu kvasinek ve stěrech nebo z primárně sterilního materiálu. přímo v komůrkách se sérem.

### 1.3.3 Sérologie

Dalšími metodami, které dovedou odhalit probíhající kvasinkovou infekci, jsou metody sérologické. Vzhledem k rychlosti a citlivosti se těchto metod používá při podezření na systémové onemocnění. Pro zlepšení prognózy systémové mykotické infekce je totiž včasná diagnóza nezbytná. Pro sérologický průkaz se jako klinický materiál používá nejčastěji krevní plazma či mozkomíšni mok (Koukalová et al. 2011).

Sérologie kvasinkových infekcí je vysoce specifická. Detekují se pomocí nich antigeny patogena nebo protilátky hostitele. Nejčastěji se prokazují antigeny buněčné stěny kvasinek, jako kandidový mannan či kryptokokový glykuronoxylomannan u kryptokoka. Ze sérologických technik se za tímto účelem používají „enzyme-linked-immunosorbent essay“ (ELISA) a latexová aglutinace (Jedličková 2006).

K průkazu antigenu, který zahrnuje spektrum původců mykotických infekcí na úrovni taxonomického oddělení, je panfungální metoda detekce (1→3)-β-D-glukanu. Antigenem je zde polysacharid obsažený v hojném množství v buněčné stěně askomycet. U většiny basidiomycet se vyskytuje jen v minimálním množství. U zygomycet zcela chybí. K vlastní detekci se používá lyzátu z amébocytů ostrorepa druhu *Limulus polyphemus*. (Kocmanová et al. 2007).

Kandidy patří k běžné mikroflóře kůže či sliznic a způsobují infekce pouze oportunního charakteru. Protilátky proti nim jsou tedy detekovatelné i u zdravých jedinců, a proto se v mykologické praxi používá jejich průkazu v diagnostice kvasinkových infekcí jen vzácně (Bednář et al. 2009).

### 1.3.4 Biochemické testy

Tyto metody průkazu původce kvasinkové infekce jsou založeny na rozdílné biochemické aktivitě jednotlivých druhů kvasinek. Nejčastěji se využívá jejich schopnosti či neschopnosti fermentovat a asimilovat zdroje uhlíku.

K průkazu asimilace uhlíkatých látek, nejčastěji sacharidů a cukerných alkoholů, se užívá biochemických testů zvaných auxanogramy. Lze je použít při identifikaci nejen askomycetárních, ale i basidiomycetárních kvasinek. K určení auxanogramu se používá suspenze jedné kolonie kvasinkové kultury narostlé na 1,5 ml roztoku tekutého média Yeast Nitrogen Base (YNB) v časovém rozmezí 24-48 h. YNB pro kvasinky představuje vhodný zdroj dusíku. Po smísení a důkladném promíchání s 10 ml rozehrátého agaru se nechá ztuhnout. Na povrch agaru se umístí disky napuštěné 10% roztoky testovaných druhů sacharidů, případně alkoholů. Následně se nechá takto připravená půda 10 dní inkubovat dnem vzhůru při 30 °C po dobu 1-3 dnů. Disky, kolem nichž je zaznamenána zvýšená intenzita růstu v podobě zákalové kruhové zóny, jsou hodnoceny jako pozitivní (Koukalová et al. 2011).

Schopnost fermentace je typická pouze pro pravé askomycetární kvasinky. Biochemické testy založené na tomto principu se nazývají zymogramy. V tomto testu je užito tekutého média obsahující pepton a testovaný sacharid. Touto směsí se naplní zkumavky s plynovkami. Jako indikátor pH se používá bromthymolová modř, která slouží jen ke kontrole kvality média, jinak sama nemá diagnostický význam. K inokulaci média se používá 24-48 h stará kultura kvasinky. Buňky kvasinek se zpočátku množí v médiu aerobně na jeho povrchu. Inkubace probíhá při teplotě 25-30 °C po dobu až 3 týdnů, během níž se buňky postupně usazují na dně zkumavky, kde je snižena koncentrace kyslíku. Je tedy patrná změna typu metabolismu na anaerobní. Jako pozitivní reakce je hodnocena pouze tvorba plynu. Okyselení média je spíše projevem asimilace (Koukalová et al. 2011).

Schopnost hydrolyzovat močovinu a produkovat ureázu se testuje na modifikovaném Christensenově agaru (mCHA) (Kocková Kratochvílová 1982; Szaniszlo 1985). Na šikmý mCHA se inokuluje zjišťovaná kvasinka vpichem na povrch. V případě ureáza-pozitivních basidiomycetárních kvasinek (*Cryptococcus*, *Rhodotorula*) změní médium barvu ze žluté na růžovou a v případě ureáza-negativních askomycetárních kvasinek (*Candida*, *Geotrichum*) zůstane barva média nezměněna (Otčenášek et al. 1990). Další možností identifikace kvasinek na základě biochemické aktivity je použití komerčních souprav obsahujících řadu substrátů a umožňující tak daleko přesnější určení.



Tvorbu extracelulárního škrobu typickou pro kryptokoky lze prokázat kultivací na speciálním glukózovém médiu s přidavkem thiaminu, na kterém u hub závisí metabolismus dusíku (Kocková-Kratochvílová 1982; Kocková-Kratochvílová et al. 1986). Po 2-3 týdnech inkubace při 25-30 °C se na narostlé kolonie kápne roztok jódu, např. Lugolův roztok. Zbarví-li se půda kolem kolonií modře, je tvorba extracelulárního škrobu pozitivní (Otčenášek et al. 1990).

### 1.3.5 Molekulárně biologické metody

Molekulárně biologické jsou sice finančně i technicky náročnější než metody sérologické, ale výhodou je krátká doba do získání výsledků a přesná specifikace patogena. Molekulárně genetickou analýzou lze detekovat DNA i RNA. K výhodám i nevýhodám naopak patří jejich vysoká citlivost. U kandid jsou detekovány geny pro rRNA, enzymy i jiné proteiny specifické pro konkrétní mykoorganismy (Jedličková 2006).

Metodou pro účinnou detekci a kvantifikaci základních infekčních agens houbového původu je polymerázová řetězová reakce (PCR), která umožňuje rychle a přesně rozeznat cílové sekvence DNA v klinickém vzorku (Lengerová et al. 2009).

PCR mnohonásobně nakopíruje DNA patogena. Její princip spočívá v opětovné replikaci úseku DNA, který je vymezen specifickými primery. K tomu se využívá termostabilní DNA polymerázy izolované z bakterie *Thermus aquaticus*. Technika PCR zvaná kvantitativní PCR v reálném čase (RTq PCR) využívá fluorescenčních sond či barviv. Ty pak detekují amplifikaci DNA během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhoda oproti konvenční PCR je možnost přesného určení výchozího počtu kopií příslušného úseku DNA, tedy schopnost kvantifikace (Avni et al. 2010).

## 1.4 β-GLUKAN U KVASINEK

### 1.4.1 Charakterizace β-glukanů

β-glukany patří mezi přirozené polysacharidy. Je to poměrně heterogenní skupina polyglukóz. Je pro ně charakteristická β-D-glukanová struktura. Skládají se z D-glukopyranosylových jednotek spojených β-glykosidickou vazbou (viz. **Schémata 1.-2.**) (Zekovič et al. 2005).

(1→3)-β-D-glukany jsou primárně nerozpustné. Skládají se z (1→3)-β vazeb v hlavním řetězci a několika postranních řetězců různé délky pospojovaných (1→6) nebo (1→4) vazbami. Jejich terciální struktura je pak stabilizována vodíkovými můstky. Parametry,

kteří charakterizují (1→3)-β-D-glukany, jsou: primární struktura, rozpustnost, stupeň větvení, molekulární hmotnost, náboj a konformace. (1→3)-β-D-glukany mohou nabývat konformace prosté šroubovice, trojšroubovice nebo náhodně spletené konformace. Všechny tyto faktory hrají významnou roli v jejich biochemické aktivitě (Zekovič et al. 2005).

β-glukany lze rozdělit do tří oddělení podle rozpustnosti: 1. oddělení obsahuje (1→3)-β-glukany nerozpustné v zásadách ani kyselinách, 2. oddělení zahrnuje (1→3)-β-glukany rozpustné v zásadách a do 3. oddělení patří vysoce větvené (1→6)-β-glukany. Glukany 1. oddělení se zřejmě účastní udržování tvaru a pevnosti buněčné stěny, glukany 2. oddělení udělují buněčné stěně elasticitu a glukany 3. oddělení hrají klíčovou roli právě při tvorbě buněčné stěny a jejich řetězce interagují s chitinem a mannoproteiny (Fleet 1991; Smits et al. 1999).

(1→6)-β-D glukany hrají klíčovou roli v organizaci buněčné stěny díky spojení s (1→3)-β-D-glukany, mannoproteiny a chitinem (Kollar et al. 1997).

(1→3) a (1→6)-β-D glukany tvoří povrchový komponent buněčných stěn hub včetně kvasinek důležitý především účastí na morfogenetických změnách stejně jako navazováním patogenních či symbiotických vztahů se živočichy i vyššími rostlinami (Asada et al. 1982; Friend et Threlfall 1976; Heinfuss et Williams 1976; Usov 1993).

β-glukany jsou pravidelně zastoupeny v buněčných stěnách askomycet, řas, vyšších rostlin i některých bakterií, kdežto v buněčných stěnách většiny basidiomycet se β-glukany vyskytují pouze ve stopovém množství a u zygomycet zcela chybí. Narozdíl od chitinu jsou však glukany situovány ve vnějších vrstvách buněčné stěny. U askomycet jsou zastoupeny v buněčné stěně až z 80 % (Bell et al. 1992).

(1→3) a (1→6)-β-D glukany jsou důležitou součástí skeletální struktury udávající buněčné stěně pevnost a tvar. Především u basidiomycet a oomycet mají spíše zásobní funkci. Slouží jako zásobárna sacharidů, které si sama buňka umí do buněčné stěny zabudovat v době hojnosti zásob a naopak v troficky nepříznivém období opětovně převést pomocí specifických hydroláz do rozpustné formy (Misaki et al. 1981).

Jako hlavní součást buněčné stěny askomycet jsou tyto glukany důležité při růstu a morfogenezi za účasti příslušných hydroláz a syntetáz. Mnoho (1→3)-β-D glukánů je předmětem studia biochemie a lékařských aplikací pro svou vysokou biologickou aktivitu (Adachi et al. 1989).

β-glukany jsou v buněčné stěně kvasinek zastoupeny ve dvou formách. Fibrilární (1→3)-β-glukan je rozpustný v zásadách, pokud nekomunikuje s chitinem, a amorfní (1→6)-

$\beta$ -glukan rozpustný jen v kyselinách. Pokud (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glukan komunikuje s chitinem, stává se zcela nerozpustným. (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glukan tvoří nejspodnější vrstvu buněčné stěny, která interaguje s cytoplazmatickou membránou. (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukan zase převládá ve středních vrstvách buněčné stěny. Obě tyto formy  $\beta$ -glukanu dávají buněčné stěně tvar a pevnost (Janderová et Bendová 1999).

Kvasinkové glukany mají hlavní řetězec s navázanými (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D glukopyranosylovými jednotkami s náhodně připojenými postranními řetězci s (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D glukopyranosylovými jednotkami (Manners et al. 1973).

Tyto (1 $\rightarrow$ 3) a (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D glukany jsou obvykle vysoce větvené a často je nacházíme na vnitřní straně buněčné stěny, někdy kovalentně navázané na jiné polymery, především na polysacharidy jako například chitin. (Kim et al. 2000).

Glukany buněčné stěny *S. cerevisiae* se skládají ze dvou odlišných makromolekulárních komponent složených postupně z (1 $\rightarrow$ 3) navázaných  $\beta$ -D-glukopyranosylových radikálů s malým množstvím (1 $\rightarrow$ 6) navázaných větví a menších komponent dalších (1 $\rightarrow$ 3) a (1 $\rightarrow$ 6) větví.  $\beta$ -glukany *S. cerevisiae* se nacházejí v náhodných pletencích vláken nebo organizovanějších konformacích, které tvoří retikulární strukturu tvořenou jednoduchými šroubovicemi a trojšroubovicemi stabilizovanými vodíkovými můstky (Kogan 2000).

Studie (1 $\rightarrow$ 3) a (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glukanů *S. cerevisiae* založené na technikách molekulárního mechanismu potvrdily, že (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukanový řetězec jednoduché šroubovice má glykosidickou vazbu  $[\varphi, \psi] = (-100^\circ, 140^\circ)$  s šesti  $\beta$ -D-glukopyranosylovými jednotkami na jednu otáčku. Navíc ještě dvě různé nízkoenergetické konformace (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glukanů měly úhly mezi vodíky  $[\varphi, \psi, \omega] = (-87,7^\circ, 179,9^\circ, -79,6^\circ)$  a  $[\varphi, \psi, \omega] = (-85,5^\circ, 179,9^\circ, -177,7^\circ)$ , které jsou důkazem vysoké pružnosti (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glukanového postranního řetězce. Ve vodném roztoku však tento jednohelixový řetězec tvoří trimerní trojhelixovou strukturu, která je spojena vodíkovými můstky, jež dost snižují celkovou energii celé chemické struktury (Deslandes et al. 1980; Saito et al. 1991; Yoshioka et al. 1998).

$\beta$ -glukany mají hojný výskyt u různých taxonomických skupin organismů. Podle kvantitativního zastoupení v buněčné stěně a různých chemických modifikací se různí i triviální název. Některé druhy bakterií jako například *Alcaligenes faecalis* produkují při fermentaci kurdlan. Ten je tvořen (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -vázanými glukosovými zbytky a vykazuje neobvyklé vlastnosti, které jsou dány schopností vytvořit ve vodě elastický gel po jejím

zahřátí. Tento gel je velmi stabilní v širokém rozmezí pH a za různých reakčních podmínek. Tvorba gelu a jeho schopnost na sebe vázat molekuly vody je předmětem zájmu potravinářského a farmaceutického průmyslu (Jezequel 1998).

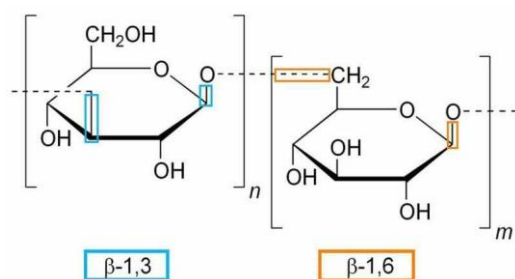
U řas se  $\beta$ -glukany vyskytují jako zásobní látky. Známy je laminarin u hnědých řas, paramylon u krásnooček nebo chrysolaminaran u rozsivek a zlativek (Kalina et Váňa 2005). Tyto laminarany patří do kategorie nízkomolekulárních zásobních  $\beta$ -glukanů obsahujících (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukopyranosové řetězce, přičemž některé jsou větveny šestikyslíkatými vazbami. Mají dva základní strukturní typy. Prvním typem jsou G-řetězce, druhý typ je pak přes atom kyslíku zakončen substituovaným D-mannitolem (Percivall et McDowell 1967; Stone et Clarke 1992).

U vyšších rostlin se  $\beta$ -glukany nejčastěji nacházejí ve formě celulózy, a to zejména u obilovin jako jsou *Secale cereale*, *Triticum sativum*, *Oryza sativa* a *Sorghum bicolor*. Vyskytují se v nich jako komponenty membrán endospermu těchto rostlin v podobě (1 $\rightarrow$ 3) a (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glukanů (Manners et Sturgeon 1982).

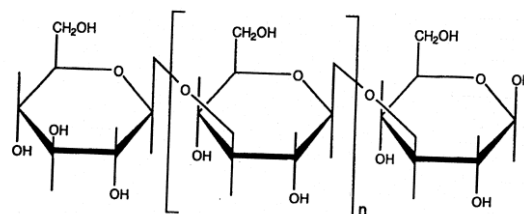
U lišejníků je vzhledem k jejich komplexitě též značný obsah (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukanu, ale také (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glukanu s triviálním názvem lichenin (Olafsdottir et Ingolfssdottir 2001).

Dokonce i ve stěnách některých jedlých stopkovýtrusých hub jako jsou *Grifola frondosa* či *Auricularia auricula-judae* se vyskytují glukany ve vyšším zastoupení (Misaki et al. 1981; Adachi et al. 1989; Sone et al. 1978). V buněčné stěně jedlé houby shi-take, *Lentinus edodes*, používané v čínské kuchyni, byl popsán ve vysokém množství lentinan, což je (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan. Lentinan má do jisté míry nejen profylaktické účinky při některých nádorových onemocněních, ale i jako jejich podpůrná terapie (Saito et al 1977).

**Schéma 1.** Podjednotky  $\beta$ -glukanů



**Schéma 2.** Část  $\beta$ -glukanového řetězce



## 1.4.2 Využití $\beta$ -glukanu v diagnostice

(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glukan je polysacharid hojně zastoupen v buněčných stěnách patogenních askomycet. Již malou koncentraci v tělních tekutinách lze detekovat a takto včas diagnostikovat začínající systémovou mykotickou infekci způsobenou nejčastěji aspergily a kandidami (Kocmanová et al. 2007).

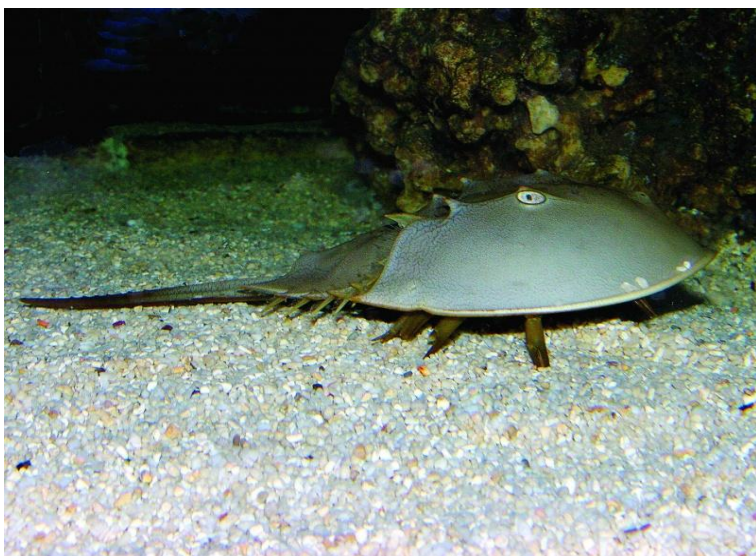
Bylo zjištěno, že (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glukan je při *in vitro* kultivaci v tekutém médiu uvolňován do prostředí v detekovatelném množství již v průběhu logaritmické fáze růstu. Modelovým organismem této studie byl *Aspergillus fumigatus*. Koncentrace (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glukanu v séru je měřena v pg/ml (Mennink-Kersten 2006). (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan je u vřecových hub významným markerem, neboť jeho hladiny jsou v tělních tekutinách detekovatelné panfungálním testem pomocí komerčních souprav (GlucateLL, FungiteLL, Fungitec G, Wako WB003 a B-G Star).

Diagnostická souprava GlucateLL; (Associates of Cape Cod - ACC, USA) obsahuje chromogenní reagent specifický pro (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan. Kvantifikuje jeho koncentraci s citlivostí 1,5 pg/ml (Finkelman 2005).

V případě soupravy FungiteLL (ACC, USA) se jedná o kolorimetrickou analýzu založenou na aktivaci zymogenu serinové proteázy, tzv. faktoru G. Tato metoda byla vyvinuta na základě podobnosti s Limulus testem, jímž lze detekovat endotoxin coby lipopolysacharid v buněčných stěnách některých gramnegativních bakterií.

Fungitec G (Seikagaku Kogyo, Japonsko) je rovněž metoda s kolorimetrickou detekcí. Hraniční hodnota se rovná 20 pg/ml. Vlastní reagentie obsahuje amébocyty ostrorepa *Trachypleus tridentatus* (viz. **Obrázek 1.**).

**Obrázek 1.:** *Trachypleus tridentatus* (Foto: Martina Balzarová)



Wako WB003 (Wako Pure Chemical Industries, Japonsko) je turbidimetrickou reakcí. Hraniční hodnota je 11 pg/ml a vlastní reagentie obsahuje amébocyty ostrorepa *Limulus polyphemus* (viz. **Obrázek 2.**).

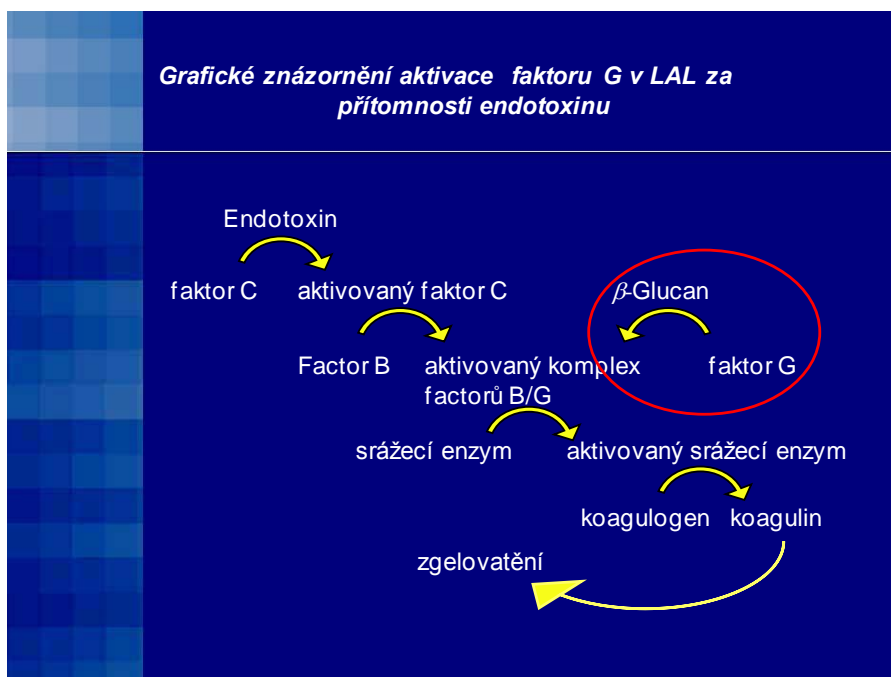
**Obrázek 2.:** *Limulus polyphemus* (Foto: Hans Hillewaer)



B-G star (Maruha Corporation, Japonsko) je soupravou založenou na kolorimetrické metodě „end point“. Hraniční hodnota koncentrace  $\beta$ -glukanu je 20 pg/ml. Vlastní reagentie obsahuje amébocyty ostrorepa *T. tridentatus*.

Výsledky testů detekující výskyt a množství (1→3)-β-D-glukanu může silně ovlivnit přítomnost bakteriálního endotoxinu. Endotoxin aktivuje faktor C, který pak aktivuje faktor B, jež pak vytváří komplex s faktorem G. Tvorba tohoto komplexu se děje také za účasti (1→3)-β-D-glukanu. Komplex faktorů B/G je nezbytný pro přeměnu koagulačního enzymu na aktivovaný koagulační enzym. Ten pak katalyzuje přeměnu koagulogenu na koagulin, který zapříčiní zgelovatění pozitivního vzorku ( viz. **Schéma 3.**) (Obayashi et al. 1992).

**Schéma 3.:** Kaskáda aktivace faktoru G za přítomnosti endotoxinu



#### 1.4.2.1 Diagnostická souprava Fungitell

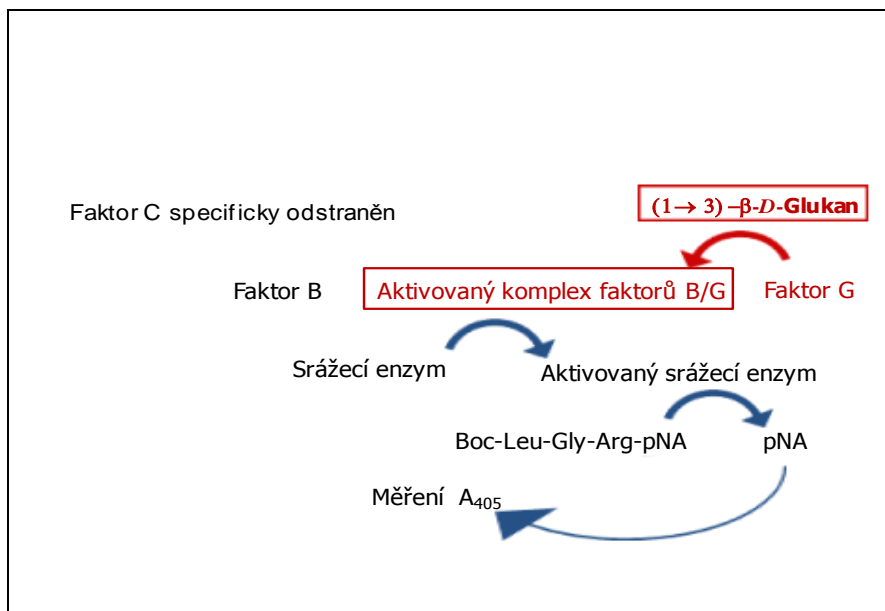
Kinetická metoda Fungitell test na stanovení (1→3)-β-D-glukanu je založena na měření rychlosti změny absorbance produkované vzorkem. Koncentrace (1→3)-β-D-glukanu ve vzorku je potom odečtena porovnáním měřených hodnot se souběžně vytvořenou kalibrační křivkou. Výsledkem je pak naměřená koncentrace (1→3)-β-D-glukanu v pg/ml. Standardní křivka je vyjádřena pěti body v rozmezí od 31 do 500 pg/ml. Přesáhne-li některý ze vzorků horní hranici kalibrační křivky je doporučeno vzorek naředit a test zopakovat. Jako negativní je hodnocen vzorek, kde koncentrace (1→3)-β-D-glukanu má hodnotu menší než 60 pg/ml. Hraniční hodnota se pohybuje mezi 60-79 pg/ml a pozitivní vzorek má pak koncentraci nad 80 pg/ml. Souprava Fungitell je *in vitro* panfungální diagnostikum s kinetickou



kolorimetrickou reakcí časně detekce systémových mykóz způsobenými askomycetami. Vlastní reagenzie obsahuje lyzát z améboctů ostrorepa *Limulus polyphemus* (LAL).

Fungitell test funguje také na principu aktivace faktoru G, ale protože je zde detekován (1→3)-β-D-glukan, musí být všechny během testu používané pomůcky a reagenzie prosty endotoxinu, jinak by se objevily falešně pozitivní výsledky. Tato detekce je založena na modifikaci dráhy LAL. Základní LAL reagenzie ze soupravy Fungitell byla modifikována tak, aby eliminovala faktor C. LAL tedy může reagovat pouze s (1→3)-β-D-glukanem za vzniku aktivovaného komplexu faktorů B/G. Aktivovaný faktor G aktivuje prokoagulační enzym na koagulační, který katalyzuje odštěpení paranitroanilinu (pNA) z chromogenního peptidového substrátu, čímž vytvoří chromofor absorbující světelný paprsek při 405 nm (viz. **Schéma 4.**).

**Schéma 4.:** LAL kaskáda specifická pro β-glukan



Soupravou Fungitell lze detekovat primární mykopatogeny (kandidy, aspergily), ale i oportunní (*Phialophora sp.*, *Exophiala sp.*, *Fusarium sp.*, *Acremonium sp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Emmonsia crescens*, *Allescheria boydii*, *Sporothrix schenckii* či *Pneumocystis jiroveci*) (Obayashi et al. 1995; Odabasi et al. 2004). Fungitell nemůže detekovat infekce vyvolané zygomycetami, které (1→3)-β-D glukan neprodukují (Mitsuya et al. 1994), kryptokokem, u něhož jsou hladiny (1→3)-β-D-glukanu jen velmi nízké (Tanaka et al. 1991; Odabasi et al. 2006), nebo kvasinkovou fází *Blastomyces dermatitidis* (Girouard et al. 2007).



Falešně pozitivní výsledky mohou vyvolat faktory biotické i abiotické. Mezi biotické faktory patří bakteriální sepsis způsobená bakteriemi obsahujícími v buněčné stěně endotoxin aktivující faktor C jako například *Pseudomonas aeruginosa*, enterokoky či pneumokoky (Menink-Kersten 2007), hemodialýza s celulózovými dialyzačními membránami (Kato et al. 2001; Kanda et al. 2001) nebo terapie specifickými frakcionovanými krevními deriváty obsahující albumin či imunoglobuliny (Ogawa et al. 2004). Abiotické faktory ovlivňující výsledek testu falešně pozitivně tvoří například aminopeniciliny s klavulanátem, karbapenemová či aminoglykosidová antibiotika nebo pomocné ošetrovatelské potřeby jako gáza, buničina či tampony, jejichž mikročástice se sekundárně dostaly do krve pacienta (Mohr et al. 2005). Falešně negativní reakci pak může vyvolat vysoká koncentrace bilirubinu či triglycerinu (Pickering et al. 2005).

Dalšími nevýhodami soupravy jsou jeho cenová i technická náročnost. Hodnoty koncentrace (1→3)- $\beta$ -D-glukanu jsou navíc měřeny v kinetickém fotometru, který představuje nezbytné přístrojové vybavení laboratoře. Práce s komerční soupravou Fungitell vyžaduje použití laboratorních pomůcek glukanu a endotoxinu zcela prostých. Cena za jedno vyšetření se pohybuje kolem 1.100 Kč. Glukan je detekován v řádech pg, a to ještě v časném stádiu infekce (Pickering et al. 2005). Výhodou je jeho široké spektrum detekovatelných patogenů (Obadasi et al. 2004). Vysoká citlivost patří mezi velké klady této detekce. Kolonizace sliznic kandidami navíc nezvyšuje hladinu glukanu v krvi n rozdíl od kandidového antigenu mannanu i aspergilového galaktomannanu (Nichterlein et al. 2003).

## 2. CÍLE PRÁCE

1. Stanovení exponenciální a stacionární fáze růstové křivky u 50 vybraných kmenů 10 klinicky nejvýznamnějších druhů kvasinek rodu *Candida*
2. Zachycení rozdílu hmotnosti v produkci biomasy na časovou jednotku v exponenciální a stacionární fázi u 50 vybraných kmenů 10 klinicky nejvýznamnějších druhů kvasinek rodu *Candida*
3. Detekce a kvantifikace  $\beta$ -glukanu standardizovanou komerční soupravou Fungitell u jednotlivých kmenů kandid
4. Normalizace měřených hodnot  $\beta$ -glukanu na suchou hmotu kultur
5. Hodnocení výsledků s cílem najít případné rozdíly v produkci  $\beta$ -glukanu a korelace hmotnosti vyprodukované biomasy s hmotností vyloučeného  $\beta$ -glukanu.

## **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 MATERIÁLY A POSTUPY**

#### **3.1.1 Přístroje a materiál**

##### **3.1.1.1 Kultivační média**

SGA (Sabouraudův agar) (Trios; Česká republika)

CRC (Colorex Candida) (Trios; Česká republika)

RPMI bujón (8,4 mg v prášku, 450 ml destilované vody, 34,5 g pufru 3-(*N*-morpholino) propansulfonové kyseliny (MOPS pufru)), Sigma-Aldrich; Česká republika)

##### **3.1.1.2 Laboratorní přístroje a pomůcky**

Glukan a endotoxin free pomůcky (Associates of Cape Cod zkr. ACC; USA)

špičky velké (1000 µl) a malé (250 µl)

zkumavky TB160 Pyrotube S

dávkovací pipeta Multipette plus s nástavci Combitips (5 ml)

komerční souprava Fungitell (ACC; USA)

třepačka Julabo SW22 (Fisher Scientific; Česká republika)

inkubátor Biological thermostat BT 120 (Laboratorní přístroje; Česká republika)

hlubokomrazicí box Sanyo (Schoeller; Česká republika)

lineární box EM 180 (MK Servis; Česká republika)

spektrofotometr Perkin Elmer Lambda 25 (Labexchange; Německo)

mikrocentrifuga Labivet spectrafuge 24D (Labnet International; USA)

biokoncentrátor Labconco (Labconco; USA)

analytické váhy (Boeco; Německo)

kinetický fotometr EL 808 (Biotek, USA)

vortex mixer Velp Scientifica Wizzard X (Lehman Scientific; USA)

počítačový program Microsoft Excel

počítačový program GEN5 (Biotek; USA)

statistický program NCSS3.

### 3.1.2 Kultury kvasinek

Vyšetřovaný soubor tvořilo 50 izolátů kvasinek. Z tohoto počtu bylo 7 kmenů sbírkových a zbylých 43 tvořily kmeny izolované z klinického materiálu pacientů Fakultní nemocnice v Olomouci (viz. **Tabulka 1.**). Všechny byly získané v období před začátkem studie. Z celkového počtu bylo vždy po 5 kmenech.

**Tabulka 1.** Charakterizace vyšetřovaných kmenů kvasinek

<b>název druhu</b>	<b>číslo kmene</b>	<b>materiál</b>
CAAL	ATCC 90028	sbírkový kmen
	3-33a	výtěr ze zevního zvukovodu
	35a	moč
	36a	endotracheální sekret
	3-40a	stěr perianální
CATR	ATCC 90874	sbírkový kmen
	8-35	sputum
	8-38	hemokultura
	8-39	výtěr z nosohltanu
	8-40	drén
CAPA	ATCC 90018	sbírkový kmen
	11-18	endotracheální sekret
	11-08	výtěr z nosohltanu
	11-15	sputum
	11-24	stěr perianální
CAKR	ATCC 90878	sbírkový kmen
	22	hemokultura
	23	hemokultura
	25	výtěr z nosohltanu
	01	moč
CAGU	ATCC 90877	sbírkový kmen
	3-09	sputum
	3-14	výtěr z nosohltanu
	3-17	stolice
	3-21	moč
CADU	2-26	sputum
	2-29	stěr z rány
	2-34	výtěr z nosohltanu
	2-35	výtěr z dutiny ústní
	2-36	sputum
	2-36	sputum
CALU	4-30	sputum
	4-33	kanyla
	4-34	stěr, výtěr z krku
	4-35	stěr, výtěr z krku
	4-36	stěr, výtěr z krku
	4-36	stěr, výtěr z krku
CAKE	4-39	sputum
	4-38	endotracheální sekret

	4-35	sputum
	4-37	bronchoalveolární laváž
	4-36	výtěr z dutiny ústní
CAFA	CBS 5481	sbírkový kmen
	4-33	výtěr z nosohltanu
	4-34	výtěr z nosohltanu
	4-35	výtěr z nosohltanu
	4-39	výtěr z nosohltanu
CAGL	ATCC 90030	sbírkový kmen
	3-08	punktát
	3-09	výtěr z nosohltanu
	3-15	moč
	3-20	sputum

**CAPA** - *C. parapsilosis*

**CAKR** - *C. krusei*

**CADU** - *C. dubliniensis*

**CAFA** - *C. fabianii*

**CAKE** - *C. kefyr*

**CALU** - *C. lusitaniae*

**CAAL** - *C. albicans*

**CAGU** - *C. guilliermondii*

**CATR** - *C. tropicalis*

**CAGL** - *C. glabrata*

Uchovávány byly ve sbírce kultur Ústavu mikrobiologie LF UP v Olomouci v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C v médiu obsahujícím 100 mg/ml Skim Milk Powder; BD International a 33 % glycerolu. Druhová identifikace klinických izolátů byla provedena před jejich uložením do sbírky na základě hodnocení morfologie a biochemické aktivity.

Před prováděním experimentů byly kultury vyočkovány na SGA a na CRC. Kontrola viability a čistoty kultur byla provedena jejich vizuální inspekcí po 48h inkubaci při 37 °C.

### 3.1.3 Metodický postup

#### 3.1.3.1 Stanovení růstové křivky kvasinek

Od každého druhu byl vybrán jeden kmen. Byly sledovány kmeny *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. krusei* ATCC 90878, *C. dubliniensis* 2-35, *C. fabianii* 4-35, *C. kefyr* 4-39, *C. lusitaniae* 4-34, *C. albicans* ATCC 90028, *C. guilliermondii* ATCC 90877, *C. tropicalis* ATCC 90874 a *C. glabrata* ATCC 90030. Každý z těchto kmenů reprezentoval studovaný druh kvasinky. Kultury narostlé na SGA po 48 h inkubace byly z jedné kolonie inokulovány do 10 ml RPMI bujónu a inkubovány 17 h ve vodní lázni s třepačkou při 30 °C a 95 otáček za minutu (rpm). Poté byla každá kvasinková kultura přeočkována do 20 ml čerstvého RPMI média, přičemž denzita suspenze byla upravena pomocí spektrofotometru tak, aby odpovídala hodnotě absorpance  $A = 0,1/660$  nm. V měření bylo dále pokračováno ve 2h intervalech až do doby, kdy se hodnoty absorpance nezvyšovaly. Pak byly všechny údaje vyneseny do grafu

a zkonstruována růstová křivka, v níž byl pro každý testovaný izolát zaznamenán časový interval, nutný k dosažení zhruba středového stádia exponenciální a počátku stacionární fáze. Pro kontrolu byl tento experiment za stejných podmínek zopakován.

### **3.1.3.2 Normalizace $\beta$ -glukanu na suchou hmotu kultur**

Po stanovení časového intervalu pro dosažení zmíněných růstových fází byly stejným metodickým postupem, jaký je popsán v kapitole 3.1.3.1, získány v odpovídající době suspenze jednotlivých izolátů v obou fázích. Z nich bylo vždy odebráno 1,5  $\mu$ l biomasy, která byla poté centrifugována v mikrocentrifuze při 3000 rpm po dobu 15 min. Za účelem získání vzorku pro měření  $\beta$ -glukanu bylo odebráno 500  $\mu$ l supernatantu, který byl následně skladován v hlubokomrazicím boxu při -80 °C. Pro stanovení hmotnosti sušiny kvasinkové biomasy byl zbytek supernatantu odstraněn a sediment centrifugován v biokoncentrátoru po dobu 120 min při 70 °C. Hmotnost sušiny byla stanovena jako rozdíl mezi hmotností mikrozkuhavky s vysušenou kvasinkovou biomasou a předem zvážené prázdné mikrozkuhavky. Výsledky byly ověřeny přesným opakováním experimentu.

### **3.1.3.3 Měření koncentrace $\beta$ -glukanu**

Pro stanovení optimální koncentrace vzorků pro měření  $\beta$ -glukanu bylo nejprve hodnoceno jeho množství při různých ředěních vzorku z kultury *C. albicans* ATCC 90028. Testovanou řadu tvořil koncentrát a dále jeho ředění 100x, 1.000x a 10.000x, 100.000x a 1.000.000x. Ke stanovení koncentrace  $\beta$ -glukanu byla využita komerční diagnostická souprava Fungitell. Metodicky bylo postupováno podle návodu výrobce. Měření  $\beta$ -glukanu bylo prováděno kinetickým fotometrem po dobu 45 min při teplotě 37 °C. Koncentrace  $\beta$ -glukanu v pg/ml byla vyhodnocena pomocí počítačového programu GEN5. Poté bylo stanoveno optimální ředění vzorku pro měření  $\beta$ -glukanu. U všech ostatních izolátů pak bylo stejným postupem hodnoceno množství  $\beta$ -glukanu pouze v tomto ředění a následně vztaženo na koncentrovaný vzorek. Experiment byl zopakován v některých případech i vícekrát, čímž se potvrdily či změnila naměřené výsledné hodnoty.

Ředěním 100x (10  $\mu$ l koncentrovaného vzorku a 990 $\mu$ l reagenční vody) vznikl 1% roztok. Koncentrace  $\beta$ -glukanu je měřena v pg/ml, které je nutné vzhledem k ředění nejprve zpětně vynásobit 100. Pomocí trojčlenky lze pak vypočítat hmotnost  $\beta$ -glukanu na celkový objem vzorku 1,5 ml. Výsledek v pg lze poté přepočítat na hmotnost vyprodukované sušiny. Vydělením hmotnosti  $\beta$ -glukanu hmotností sušiny byla vypočítáno, kolik pg  $\beta$ -glukanu daný kmen kvasinky vyprodukuje na gram sušiny.

### 3.1.2.5 Statistické hodnocení výsledků

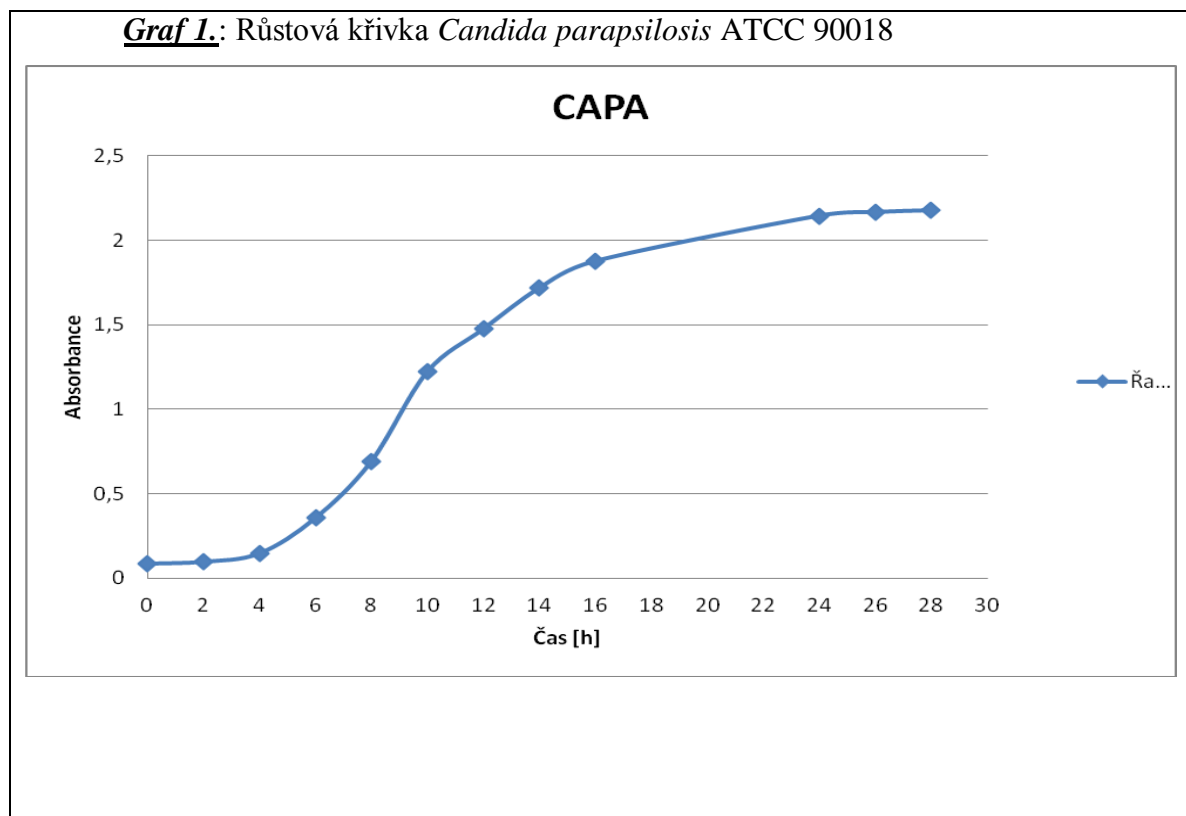
Byla testována korelace hmotnosti vyprodukovaného  $\beta$ -glukanu v pikogramech a hmotnosti vytvořené sušiny v gramech u jednotlivých deseti druhů studovaných kvasinek. Dále byly hodnoceny rozdíly v produkci  $\beta$ -glukanu u sledovaných deseti druhů.

Testování bylo prováděno programem NCSS. Hodnoty byly analyzovány zvláště ve středu exponenciální fáze a na počátku stacionární fáze růstové křivky. K hodnocení korelací byly použity Pearsonův parametrický test a Spearmanův neparametrický test. K hodnocení rozdílů vyprodukovaného  $\beta$ -glukanu byly použity ANOVA test a Turkey Kramerův test.

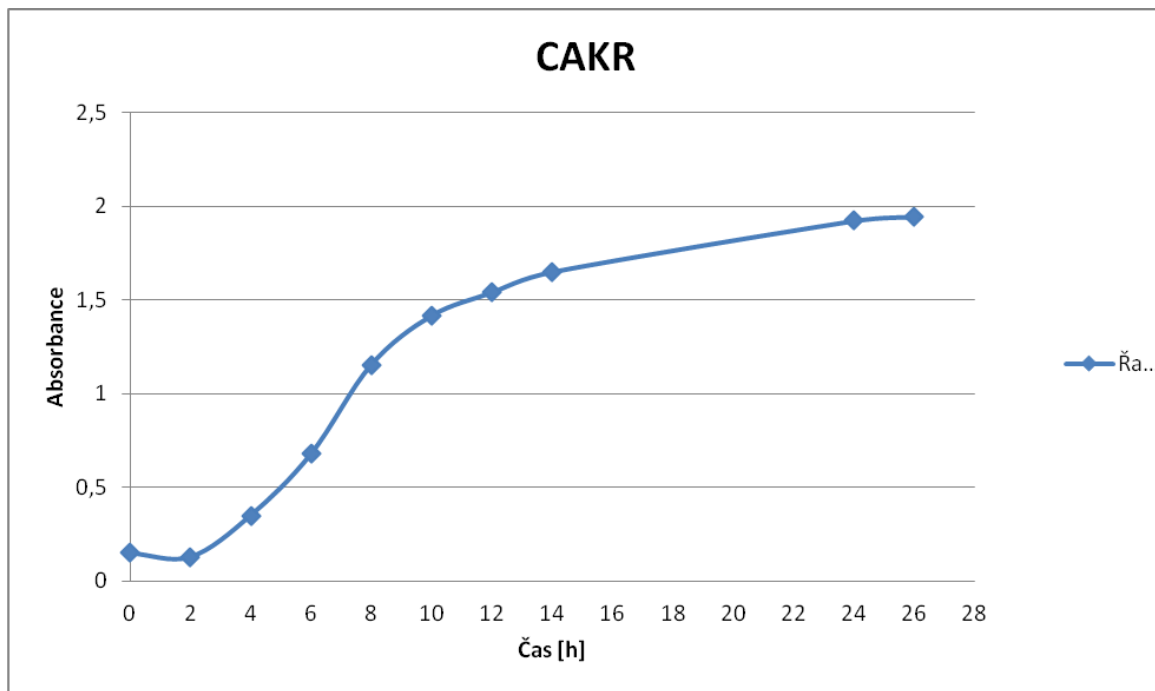
## 3.2 VÝSLEDKY

### 3.2.1 Stanovení růstové křivky kvasinek

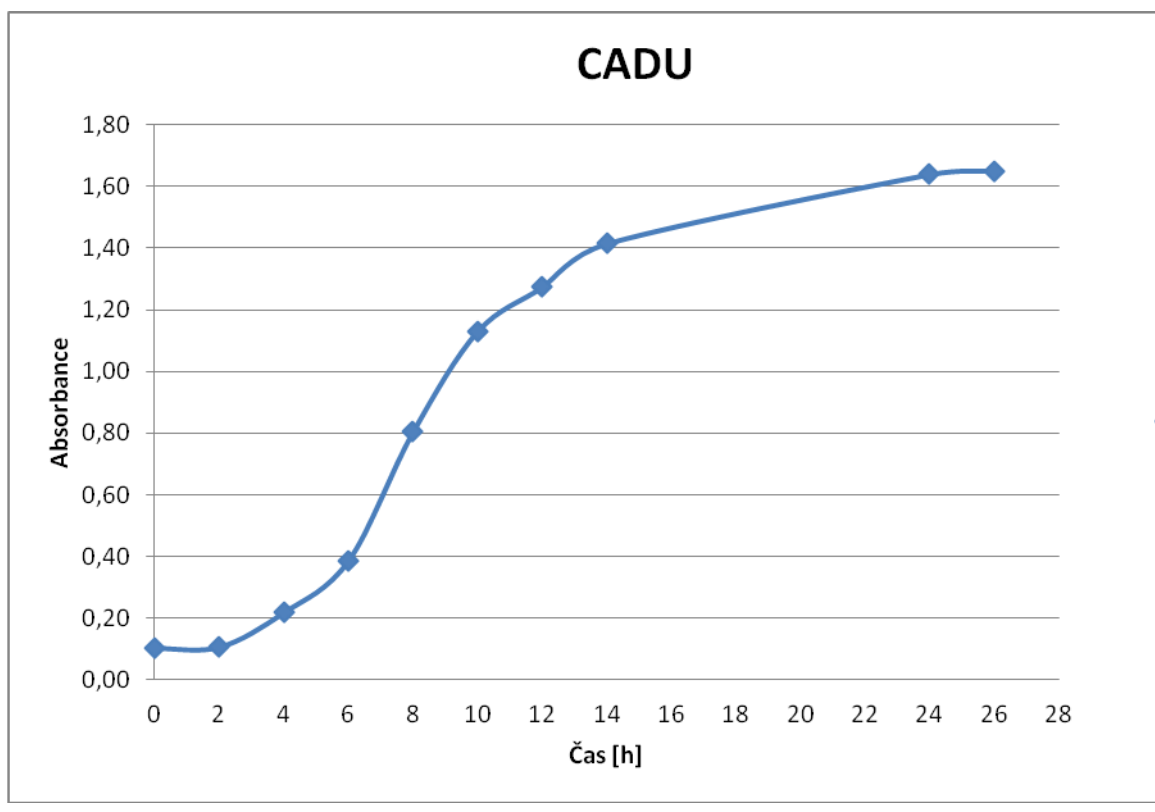
Růstové křivky jednotlivých druhů kvasinek jsou prezentovány v **Grafech 1.-10.** Vyplývá z nich, kdy u vybraných kmenů nastává střed exponenciální fáze a počátek stacionární fáze.



**Graf 2.:** Růstová křivka *Candida krusei* ATCC 90878

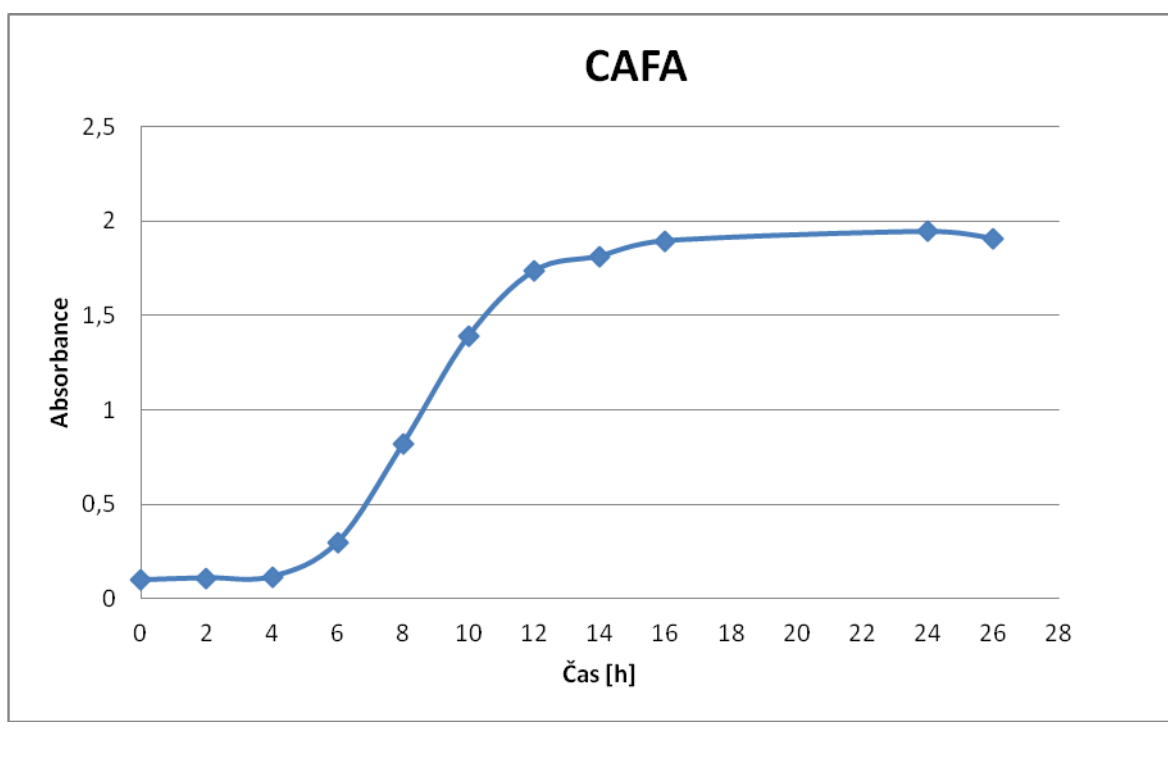


**Graf 3.:** Růstová křivka *Candida dubliniensis* 2-35

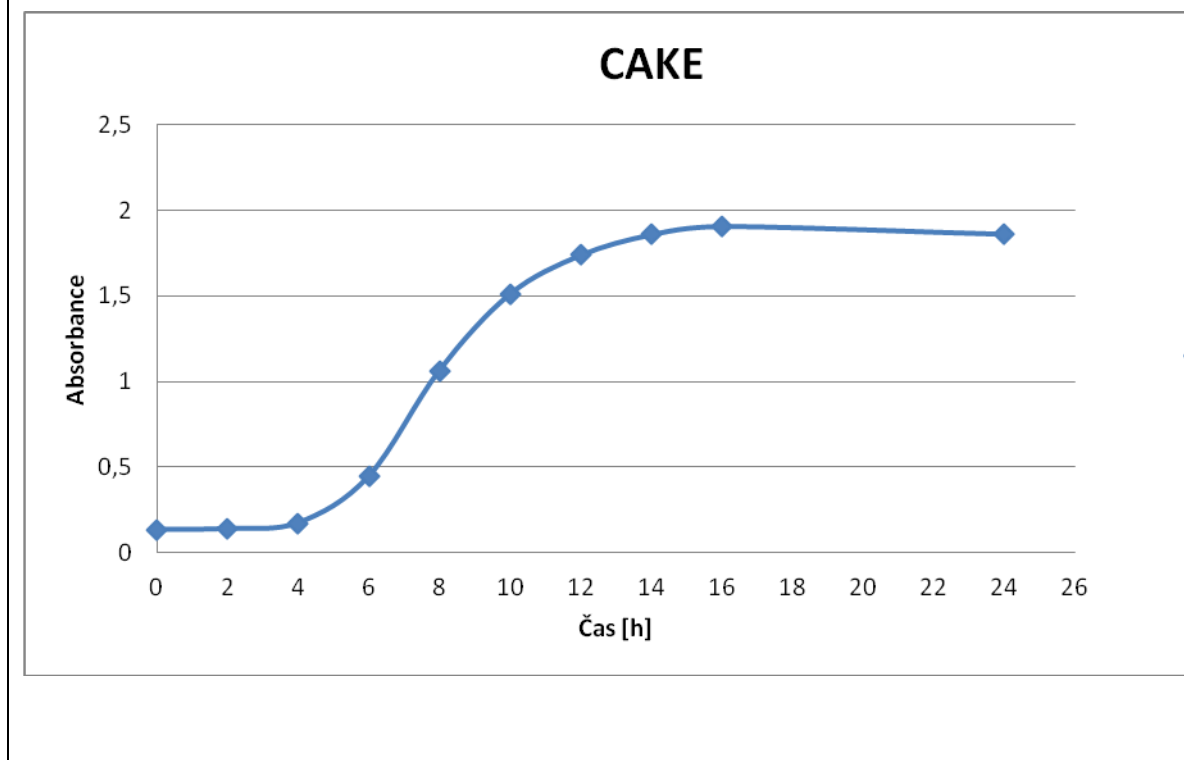




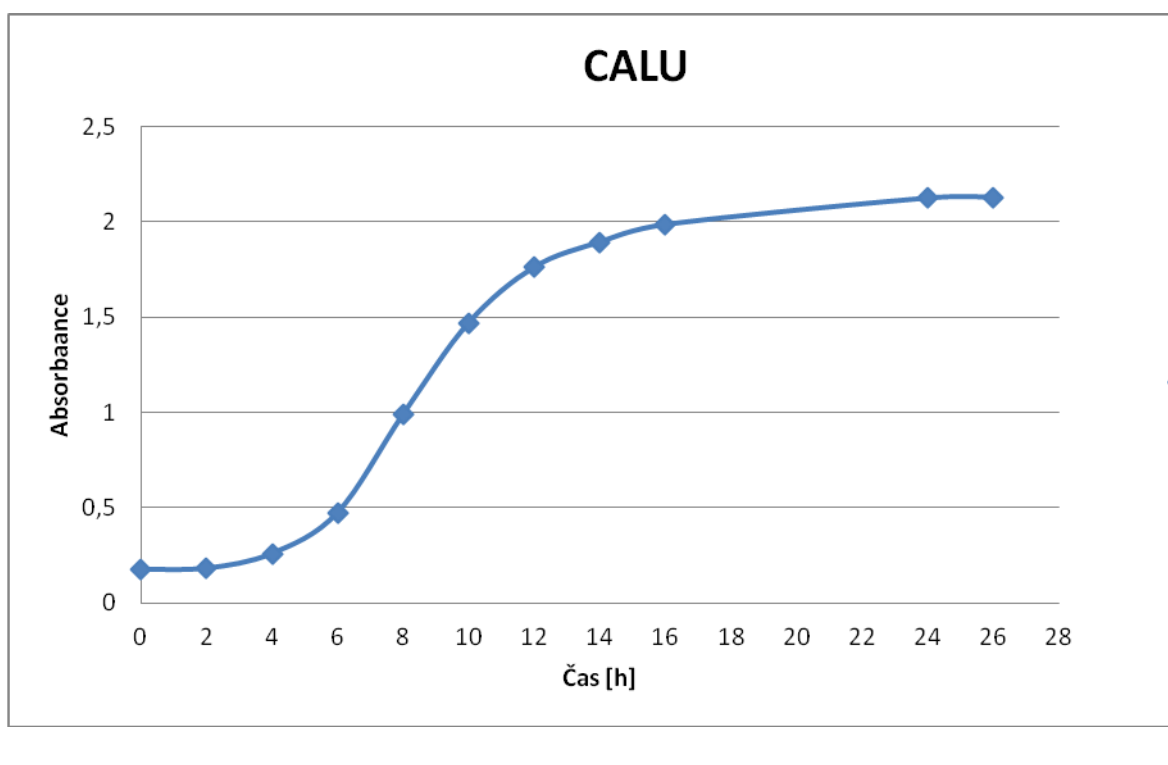
**Graf 4.:** Růstová křivka *Candida fabianii* 4-35



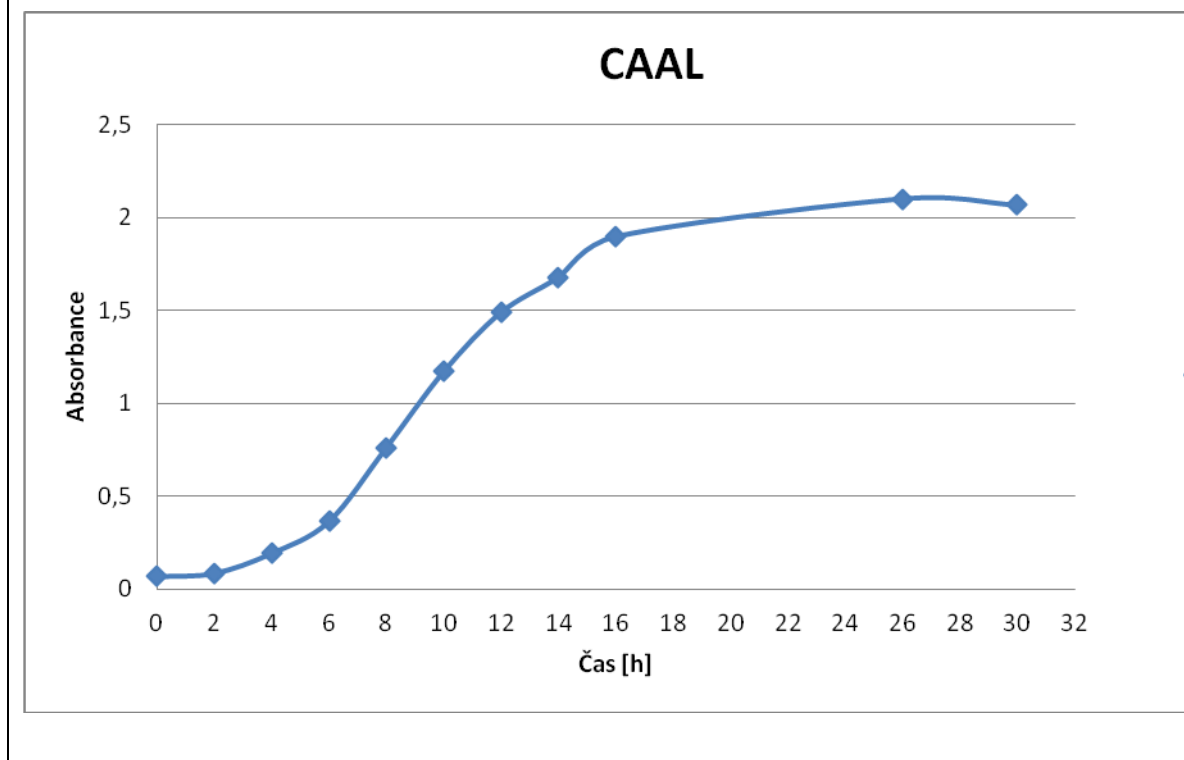
**Graf 5.:** Růstová křivka *Candida kefyr* 4-39



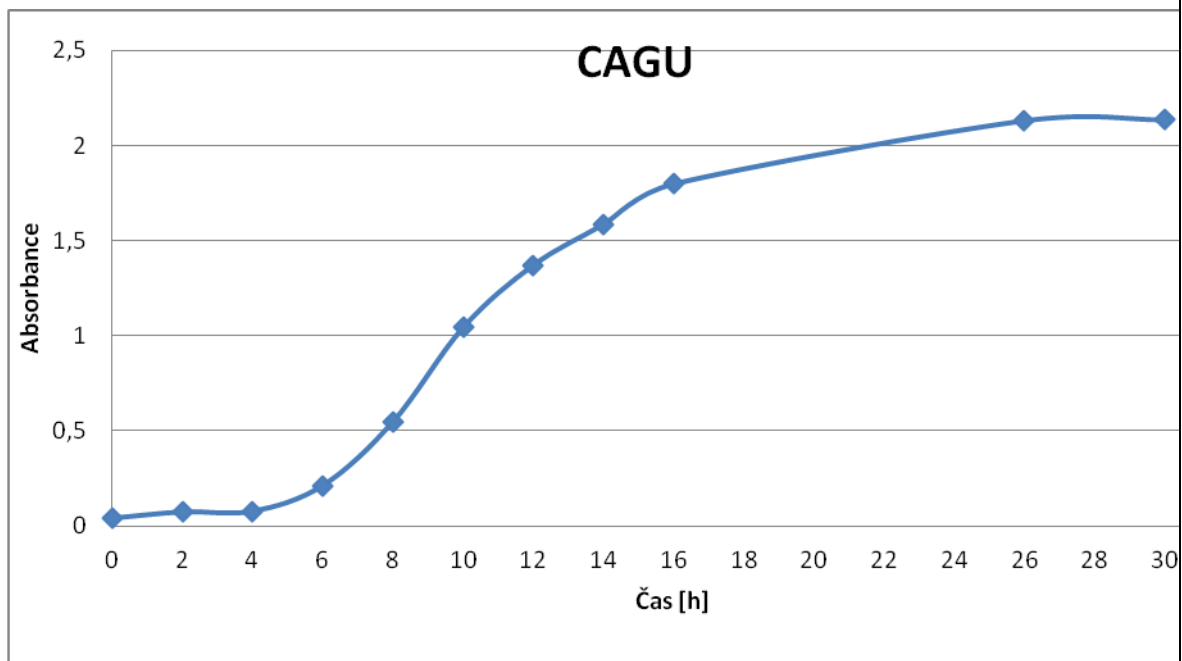
**Graf 6.:** Růstová křivka *Candida lusitaniae* 4-34



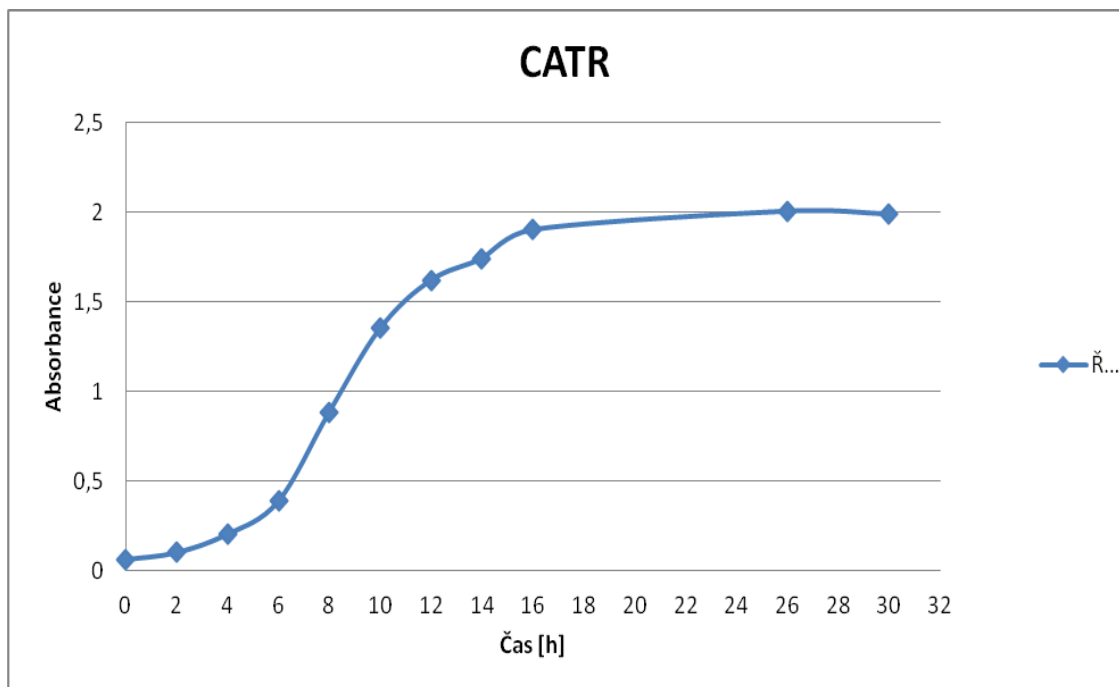
**Graf 7.:** Růstová křivka *Candida albicans* ATCC 90028



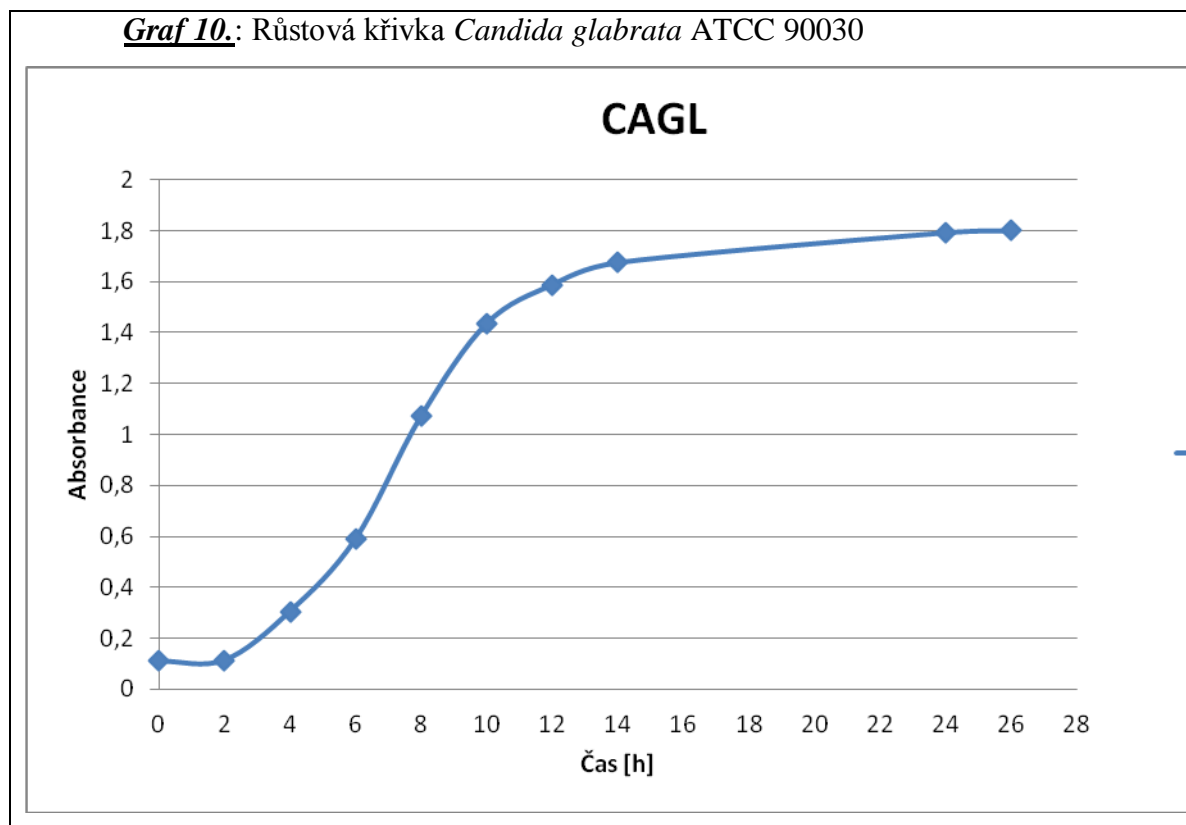
**Graf 8.:** Růstová křivka *Candida guilliermondii* ATCC 90877



**Graf 9.:** Růstová křivka *Candida tropicalis* ATCC 90874



**Graf 10.:** Růstová křivka *Candida glabrata* ATCC 90030



Časové intervaly nutné u jednotlivých druhů k dosažení středu exponenciální fáze, resp. počátku stacionární fáze jsou shrnuty v **Tabulce 2.** Nejrychleji dosáhla poloviny exponenciální fáze *C. krusei*, a to již za 7 h od inokulace. Naopak nejpomaleji dosáhla tohoto bodu *C. guilliermondii*, po 10 h. Stacionární fáze započala nejrychleji u druhu *C. tropicalis*, a to již za 20 h. Jako poslední se v exponenciální fázi ocitla *C. guilliermondii* za 28 h.

**Tabulka 2.:** Časové intervaly sledovaných fází růstu

<b>název druhu</b>	<b>Ef</b>	<b>Sf</b>
CAPA	po 8 h	po 24h
CAKR	po 7h	po 24h
CADU	po 8h	po 24h
CAFA	po 8h	po 24h
CAKE	po 8h	po 24h
CALU	po 8h	po 24h
CAAL	po 9h	po 24h
CAGU	po 10h	po 28h
CATR	po 9h	po 20h
CAGL	po 8h	po 24h

**CAPA** - *C. parapsilosis*

**CAKR** - *C. krusei*

**CADU** - *C. dubliniensis*

**CAFA** - *C. fabianii*

**CAKE** - *C. kefyr*

**CALU** - *C. lusitaniae*

**CAAL** - *C. albicans*

**CAGU** - *C. guilliermondii*

**CATR** - *C. tropicalis*

**CAGL** - *C. glabrata*

**Ef** – exponenciální fáze

**Sf** – stacionární fáze

### 3.2.2 Normalizace $\beta$ -glukanu na suchou hmotu kultur

Rozdíly suché hmotnosti biomasy v g u testovaného souboru kvasinek získané ve středu exponenciální (Ef) a na počátku stacionární fáze (Sf) jsou shrnuty v **Tabulce 3**.

**Tabulka 3.:** Suchá hmotnost biomasy kvasinek v Ex a v Sf

název kmene	čas. interval do Ef [h]	hmotnost sušiny v Ef [g]	čas. interval do Sf [h]	hmotnost sušiny v Sf [g]
CAPA ATCC 90018	8	0,0017	24	0,0026
CAPA 11-18	8	0,0012	24	0,0021
CAPA 11-08	8	0,0020	24	0,0028
CAPA 11-15	8	0,0017	24	0,0022
CAPA 11-24	8	0,0022	24	0,0028
CAKR ATCC 90878	7	0,0015	24	0,0020
CAKR 22	7	0,0016	24	0,0025
CAKR 23	7	0,0008	24	0,0015
CAKR 25	7	0,0019	24	0,0026
CAKR 01	7	0,0017	24	0,0023
CADU 2-26	8	0,0008	24	0,0013
CADU 2-29	8	0,0004	24	0,0012
CADU 2-34	8	0,0007	24	0,0015
CADU 2-35	8	0,0006	24	0,0013
CADU 2-36	8	0,0008	24	0,0011
CAFA ATCC	8	0,0006	24	0,0012
CAFA 4-33	8	0,0004	24	0,0009
CAFA 4-34	8	0,0003	24	0,0011
CAFA 4-35	8	0,0007	24	0,0015
CAFA 4-39	8	0,0007	24	0,0013
CAKE 4-35	8	0,0008	24	0,0015
CAKE 4-36	8	0,0010	24	0,0019
CAKE 4-37	8	0,0007	24	0,0011
CAKE 4-38	8	0,0004	24	0,0012
CAKE 4-39	8	0,0011	24	0,0017
CALU 4-30	8	0,0007	24	0,0012
CALU 4-33	8	0,0010	24	0,0017
CALU 4-34	8	0,0009	24	0,0014
CALU 4-35	8	0,0004	24	0,0014
CALU 4-36	8	0,0004	24	0,0008
CAAL ATCC 90028	9	0,0021	24	0,0033
CAAL 3-33a	9	0,0009	24	0,0013
CAAL 35a	9	0,0011	24	0,0029
CAAL 36a	9	0,0006	24	0,0012
CAAL 3-40a	9	0,0008	24	0,0013
CAGU ATCC 90877	10	0,0010	28	0,0019
CAGU 3-09	10	0,0007	28	0,0011
CAGU 3-14	10	0,0009	28	0,0016

CAGU 3-17	10	0,0011	28	0,0018
CAGU 3-21	10	0,0008	28	0,0013
CATR ATCC 90874	9	0,0009	20	0,0021
CATR 8-35	9	0,0013	20	0,0026
CATR 8-38	9	0,0024	20	0,0030
CATR 8-39	9	0,0005	20	0,0012
CATR 8-40	9	0,0011	20	0,0025
CAGL ATCC 90030	8	0,0007	24	0,0013
CAGL 3-08	8	0,0005	24	0,0010
CAGL 3-09	8	0,0004	24	0,0013
CAGL 3-15	8	0,0005	24	0,0012
CAGL 3-20	8	0,0006	24	0,0011

**CAPA** - *C. parapsilosis*

**CAKR** - *C. krusei*

**CADU** - *C. dubliniensis*

**CAFA** - *C. fabianii*

**CAKE** - *C. kefyr*

**Ef** – exponenciální fáze

**CALU** - *C. lusitaniae*

**CAAL** - *C. albicans*

**CAGU** - *C. guilliermondii*

**CATR** - *C. tropicalis*

**CAGL** - *C. glabrata*

**Sf** – stacionární fáze

Nejvyšší hmotnosti sušiny dosahovala v obou fázích *C. parapsilosis*. Nejnižší produktivita sušiny v obou fázích byla naměřena u *C. fabianii* a *C. glabrata*.

### 3.2.3 Měření koncentrace $\beta$ -glukanu

V prvním experimentu se ukázalo stonásobné ředění vzorku z hlediska detekovatelnosti koncentrace  $\beta$ -glukanu jako nejvhodnější.

V následujících experimentech detekce  $\beta$ -glukanu byly získány hodnoty koncentrací a vypočítána hmotnost v pg (viz. **Tabulka 4.**)

**Tabulka 4.:** Koncentrace a hmotnost  $\beta$ -glukanu v 1,5 ml vzorku

název kmene	$\sigma$ c $\beta$ -glukanu v Ef [pg/ml]	m $\beta$ -glukanu v Ef [pg]	$\sigma$ c $\beta$ -glukanu v Sf [pg/ml]	m $\beta$ -glukanu v Sf [pg]
CAPA ATCC 90018	5600,0500	8400,0750	13807,9500	20711,9250
CAPA 11-18	4491,1000	6736,6500	8965,1000	13447,6500
CAPA 11-08	1364,9600	2047,4400	7388,4500	11082,6750
CAPA 11-15	<781,2000	<1171,8000	9546,8500	14320,2750
CAPA 11-24	994,4000	1491,6000	5755,3000	8632,9500
CAKR ATCC 90878	2678,0000	4017,0000	21273,2000	31909,8000
CAKR 22	2430,3000	3645,4500	7961,9000	11942,8500
CAKR 23	2220,5000	3330,7500	3813,5000	5720,2500
CAKR 25	2313,3500	3470,0250	7148,5500	10722,8250
CAKR 01	2184,0000	3276,0000	9952,7000	14929,0500
CADU 2-26	25385,6000	38078,4000	26136,1000	39204,1500
CADU 2-29	25192,4000	37788,6000	24119,5500	36179,3250
CADU 2-34	21784,9000	32677,3500	36533,4000	54800,1000
CADU 2-35	24150,9000	36226,3500	26816,4000	40224,6000

CADU 2-36	21324,4000	31986,6000	23842,2000	35763,3000
CAFA ATCC	<781,2000	<1171,8000	<781,2000	<1171,8000
CAFA 4-33	<781,2000	<1171,8000	<781,2000	<1171,8000
CAFA 4-34	<781,2000	<1171,8000	<781,2000	<1171,8000
CAFA 4-35	<781,2000	<1171,8000	8383,9000	12575,8500
CAFA 4-39	<781,2000	<1171,8000	<781,2000	<1171,8000
CAKE 4-35	1269,7000	1904,5500	1476,9000	2215,3500
CAKE 4-36	998,9800	1498,4700	1575,7000	2363,5500
CAKE 4-37	1101,4500	1652,1750	1163,7500	1745,6250
CAKE 4-38	1265,3000	1897,9500	1951,4000	2927,1000
CAKE 4-39	1559,4700	2339,2050	2005,5200	3008,2800
CALU 4-30	6096,1000	9144,1500	12152,2000	18228,3000
CALU 4-33	12569,7000	18854,5500	28496,1000	42744,1500
CALU 4-34	10483,4000	15725,1000	10375,8000	15563,7000
CALU 4-35	17058,2000	25587,3000	17469,0000	26203,5000
CALU 4-36	17012,1000	25518,1500	13155,4000	19733,1000
CAAL ATCC 90028	1708,1000	2562,1500	4218,6500	6327,9750
CAAL 3-33a	1434,1000	2151,1500	11353,7000	17030,5500
CAAL 35a	5114,9000	7672,3500	10738,0500	16107,0750
CAAL 36a	6914,4500	10371,6750	36268,3000	54402,4500
CAAL 3-40a	2403,1000	3604,6500	2836,7000	4255,0500
CAGU ATCC 90877	19566,9000	29350,3500	26486,8000	39730,2000
CAGU 3-09	20218,9000	30328,3500	21962,8000	32944,2000
CAGU 3-14	4007,0000	6010,5000	10773,4500	16160,1750
CAGU 3-17	1436,3000	2154,4500	7356,9000	11035,3500
CAGU 3-21	5741,7000	8612,5500	13255,0000	19882,5000
CATR ATCC 90874	1123,9000	1685,8500	13530,9000	20296,3500
CATR 8-35	19476,2000	29214,3000	20011,5000	30017,2500
CATR 8-38	6458,5000	9687,7500	16801,5000	25202,2500
CATR 8-39	1228,4500	1842,6750	1929,8000	2894,7000
CATR 8-40	2120,4000	3180,6000	2061,0500	3091,5750
CAGL ATCC 90030	1393,3000	2089,9500	8871,0500	13306,5750
CAGL 3-08	1136,5400	1704,8100	2671,2400	4006,8600
CAGL 3-09	1943,0300	2914,5450	3098,1000	4647,1500
CAGL 3-15	6589,0000	9883,5000	7724,0000	11586,0000
CAGL 3-20	17809,1000	26713,6500	21093,10	31639,6500

**CAPA** - *C. parapsilosis*

**CAKR** - *C. krusei*

**CADU** - *C. dubliniensis*

**CAFA** - *C. fabianii*

**CAKE** - *C. kefyr*

**Ef** – exponenciální fáze

**CALU** - *C. lusitaniae*

**CAAL** - *C. albicans*

**CAGU** - *C. guilliermondii*

**CATR** - *C. tropicalis*

**CAGL** - *C. glabrata*

**Sf** – stacionární fáze

Z tabulky vyplývá, že největší množství  $\beta$ -glukanu vyprodukovala z testovaných druhů v obou fázích *C. dubliniensis*. Nejnižších koncentrací pod prahem detekce při stonásobném ředění dosahuje *C. fabianii* a kmen *C. parapsilosis* 11-15.

### 3.1.2.4 Výpočet hmotnosti $\beta$ -glukanu

Hmotnost vyprodukovaného  $\beta$ -glukanu přepočítaná na g vytvořené sušiny u sledovaných druhů kvasinek byla zaznamenána v **Tabulce 5**. Kmeny s podprahovými hodnotami koncentrace  $\beta$ -glukanu v tabulce chybí.

**Tabulka 5.:** Hmotnost  $\beta$ -glukanu na jednotku hmotnosti suché biomasy

název kmene	m $\beta$ -glukanu/m sušiny v Ef [pg/g]	m $\beta$ -glukanu/m sušiny v Sf [pg/g]
CAPA ATCC 90018	4941220,5882	7966125,0000
CAPA 11-18	5613875,0000	6403642,8571
CAPA 11-08	1023720,0000	3958098,2143
CAPA 11-24	678000,0000	3083196,4286
CAKR ATCC 90878	2678000,0000	15954900,0000
CAKR 22	2278406,2500	4777140,0000
CAKR 23	4163437,5000	3813500,0000
CAKR 25	1826328,9474	4124163,4615
CAKR 01	1927058,8235	6490891,3043
CADU 2-26	47598000,0000	30157038,4615
CADU 2-29	94471500,0000	30149437,5000
CADU 2-34	46681928,5714	36533400,0000
CADU 2-35	60377250,0000	30942000,0000
CADU 2-36	39983250,0000	32512090,9091
CAKE 4-35	2380687,5000	1476900,0000
CAKE 4-36	1498470,0000	1243973,6842
CAKE 4-37	2360250,0000	1586931,8182
CAKE 4-38	4744875,0000	2439250,0000
CAKE 4-39	2126550,0000	1769576,4706
CALU 4-30	13063071,4286	15190250,0000
CALU 4-33	18854550,0000	25143617,6471
CALU 4-34	17472333,3333	11116928,5714
CALU 4-35	63968250,0000	18716785,7143
CALU 4-36	63795375,0000	24666375,0000
CAAL ATCC 90028	1220071,4286	1917568,1818
CAAL 3-33a	2390166,6667	13100423,0769
CAAL 35a	6974863,6363	5554163,7931
CAAL 36a	17286125,0000	45335375,0000
CAAL 3-40a	4505750,0000	3273115,3846
CAGU ATCC 90877	29350350,0000	20910631,5789
CAGU 3-09	43326214,2857	29949272,7273
CAGU 3-14	6678333,3333	10100109,3750
CAGU 3-17	1958590,9091	6130750,0000
CAGU 3-21	10765687,5000	15294230,7692
CATR ATCC 90874	1873166,6667	9664928,5714
CATR 8-35	22472538,4615	11545096,1538
CATR 8-38	4036562,5000	8400750,0000



CATR 8-39	3685350,0000	2412250,0000
CATR 8-40	2891454,5455	1236630,0000
CAGL ATCC 90030	2985642,8571	10235826,9231
CAGL 3-08	3409620,0000	4006860,0000
CAGL 3-09	7286362,5000	3574730,7692
CAGL 3-15	19767000,0000	9655000,0000
CAGL 3-20	44522750,0000	28763318,1818

**CAPA** - *C. parapsilosis*

**CAKR** - *C. krusei*

**CADU** - *C. dubliniensis*

**CAFA** - *C. fabianii*

**CAKE** - *C. kefyra*

**Ef** – exponenciální fáze

**CALU** - *C. lusitaniae*

**CAAL** - *C. albicans*

**CAGU** - *C. guilliermondii*

**CATR** - *C. tropicalis*

**CAGL** - *C. glabrata*

**Sf** – stacionární fáze

Největší množství  $\beta$ -glukanu na gram vyprodukované sušiny bylo zaznamenáno u *C. dubliniensis* v obou fázích růstu. Naopak nejméně  $\beta$ -glukanu vyprodukovala na g sušiny v obou fázích růstu *C. kefyra*.

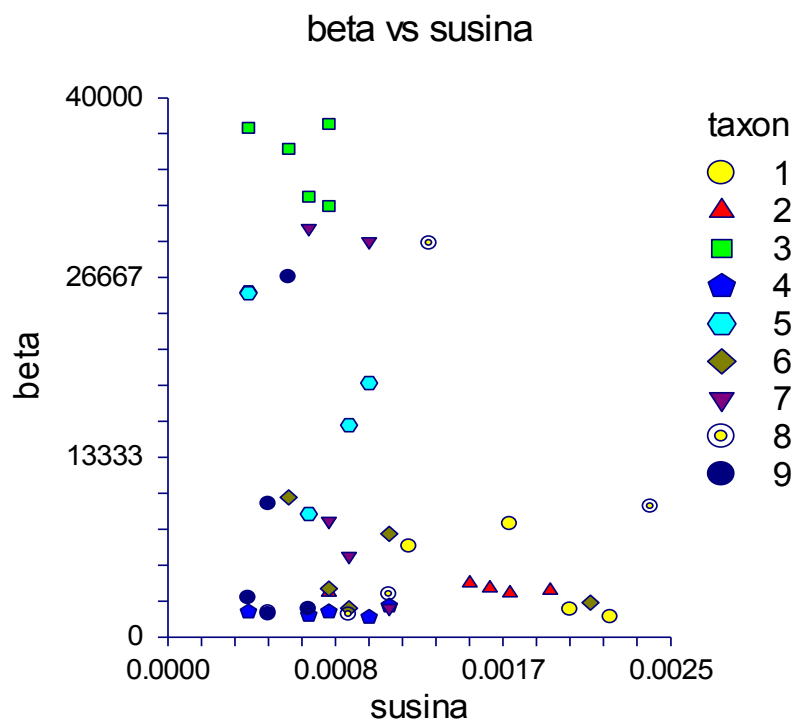
### 3.2.5. Statistické hodnocení výsledků

Ze statistického hodnocení výsledků byly vyloučeny všechny sledované kmeny *C. fabianii* a kmen *C. parapsilosis* 11-15 z důvodu nízké produkce  $\beta$ -glukanu. Při ředění 100x nedosahují zmíněné kmeny kvasinek ve vzorcích RPMI tekutého média dostatečně vysoké hodnoty koncentrace  $\beta$ -glukanu, které by byly *Fungitell* testem detekovatelné.

Taxony 1-9 představují sledované druhy kvasinek v tomto pořadí: *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. kefyra*, *C. lusitaniae*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*. Barevné symboly představují jednotlivé kvasinkové kmeny.

## Exponenciální fáze

**Graf 11.:** Lineární závislosti hmotnosti sušiny a hmotnosti beta-glukanu



Pearsonův i Spearmanův korelační koeficienty vyšly u všech taxonů ( $r$ ,  $r_s < 0,1$ ). V regresní analýze hmotnosti vyprodukovaného  $\beta$ -glukanu a hmotnosti sušiny ukázaly oba testy v daných znacích nelinearitu. Ani jedna korelace nebyla signifikantní. Hmotnost vyprodukovaného  $\beta$ -glukanu tedy v exponenciální fázi nekorelovala s hmotností vytvořené biomasy.

### Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: taxon	8	4.424923E+09	5.531153E+08	9.49	0.000001*	0.999996
S	35	2.040604E+09	5.830297E+07			
Total (Adjusted)	43	6.465526E+09				
Total	44					

\* Term significant at alpha = 0.05

### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

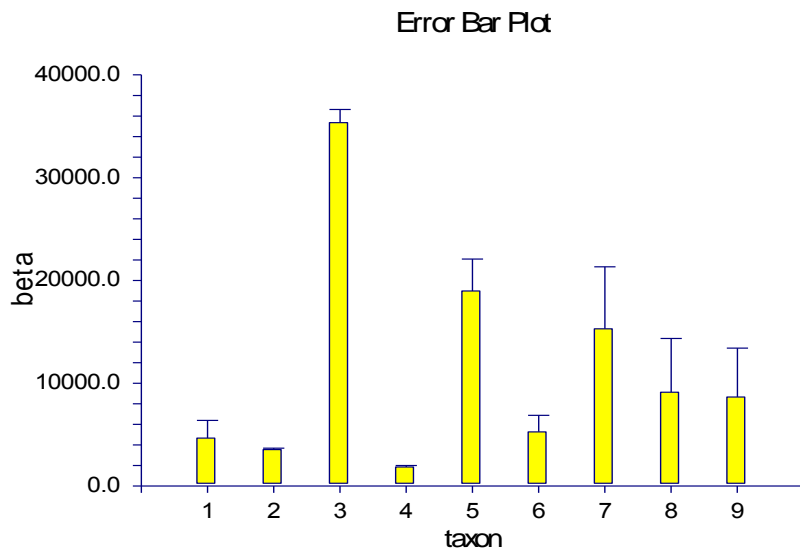
Response: beta  
Term A: taxon

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=35 MSE=5.830297E+07 Critical Value=4.6709

Group	Count	Mean	Different From Groups
4	5	1858.47	5, 3
2	5	3547.845	3

1	4	4668.941	3
6	5	5272.395	3
9	5	8661.291	3
8	5	9122.235	3
7	5	15291.24	3
5	5	18965.85	4, 3
3	5	35351.46	4, 2, 1, 6, 9, 8, 7, 5

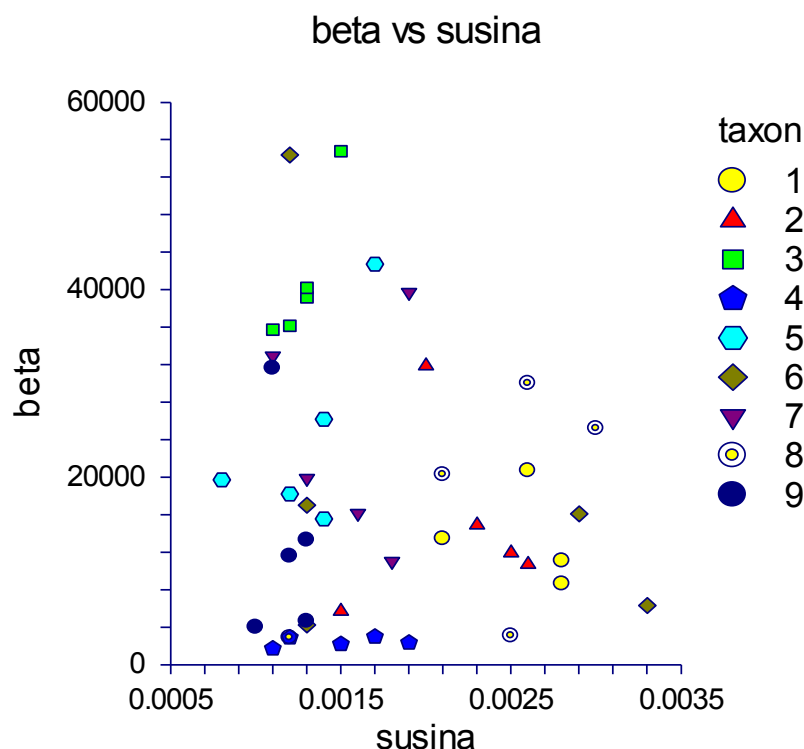
**Graf 12.:** Srovnání druhů kvasinek v produkci beta-glukanu



Jednocestná ANOVA a Tukey-Kramerův test ukázaly signifikantní rozdíly ( $p < 0,0001$ ) v produkci  $\beta$ -glukanu v exponenciální fázi mezi jednotlivými druhy testovaných kvasinek rodu *Candida*. Výrazně se v produkci liší *C. dubliniensis*, která produkuje největší množství  $\beta$ -glukanu ze všech testovaných druhů. *C. kefyra* naopak produkuje  $\beta$ -glukanu nejméně ze všech. Hodnoty jednotlivých druhů byly zprůměrovány pro dané druhy. Počítá se i se standardní chybou, která vznikla zaokrouhlením jednotlivých hodnot.

## Stacionární fáze

**Graf 13.:** Lineární závislosti hmotnosti sušiny a hmotnosti beta-glukanu



Pearsonův i Spearmanův korelační koeficienty vyšly pouze u kmenů *Candida dubliniensis* ( $r, r_s > 0,9$ ). U tohoto druhu tedy ve stacionární fázi existuje velmi silná korelace mezi hmotnostmi vyprodukovaného  $\beta$ -glukanu a hmotnostmi vytvořené biomasy. Hladina významnosti ( $p = 0.022236$ ), což znamená, že pravděpodobnost náhody je menší než 2,22 %. U ostatních druhů nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi testovanými veličinami.

### Pearson Correlations (Row-Wise Deletion)

*Candida dubliniensis*

	beta	susina
beta	1.000000	$r=0.929491$
	0.000000	$P=0.022236$
	5.000000	$n=5.000000$
susina	0.929491	1.000000
	0.022236	0.000000
	5.000000	5.000000

### Spearman Correlations (Row-Wise Deletion)

*Candida dubliniensis*

	beta	susina
beta	1.000000	$r_s=0.974679$
	0.000000	0.004818
	5.000000	5.000000
susina	0.974679	1.000000
	0.004818	0.000000

5.000000 5.000000

### Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: taxon	8	4.531194E+09	5.663993E+08	4.35	0.001024*	0.983339
S	35	4.55792E+09	1.302263E+08			
Total (Adjusted)	43	9.089114E+09				
Total	44					

\* Term significant at alpha = 0.05

### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

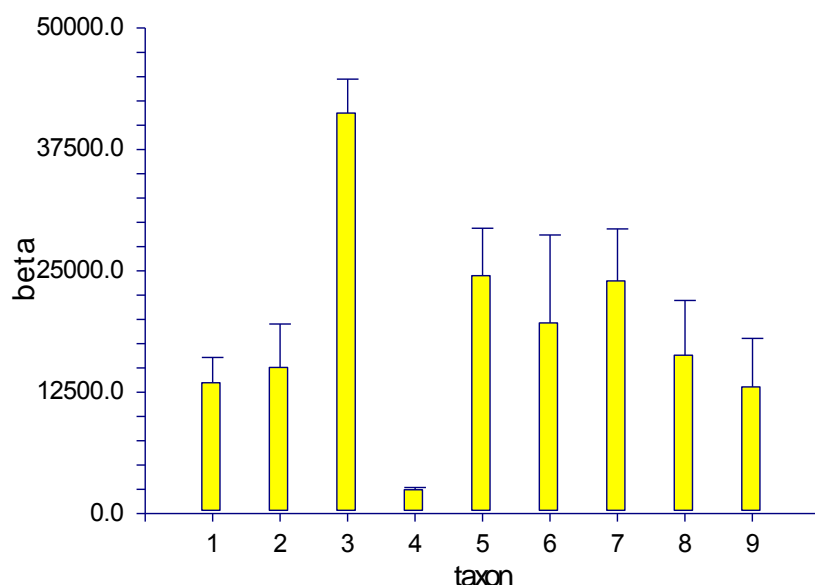
Response: beta  
Term A: taxon

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=35 MSE=1.302263E+08 Critical Value=4.6709

Group	Count	Mean	Different From Groups
4	5	2451.981	3
9	5	13037.25	3
1	4	13468.8	3
2	5	15044.96	3
8	5	16300.42	3
6	5	19624.62	
7	5	23950.48	
5	5	24494.55	
3	5	41234.3	4, 9, 1, 2, 8

**Graf 14.:** Srovnání druhů kvasinek v produkci beta-glukanu

Error Bar Plot



Jednocestná ANOVA a Tukey-Kramerův test ukázaly signifikantní rozdíly ( $p = 0.001$ ) v produkci  $\beta$ -glukanu ve stacionární fázi mezi jednotlivými druhy testovaných kvasinek rodu *Candida*. Výrazně se v produkci  $\beta$ -glukanu liší *C. dubliniensis*, která produkuje největší množství  $\beta$ -glukanu ze všech testovaných druhů. *C. kefyr* naopak produkuje  $\beta$ -glukanu

nejméně ze všech. Hodnoty jednotlivých druhů byly zprůměrovány pro dané druhy. Počítá se i se standardní chybou, která vznikla zaokrouhlením jednotlivých hodnot.

## 4. DISKUZE

### 4.1 STANOVENÍ RŮSTOVÉ KŘIVKY KVASINEK

Jordánské studie Al-Qadiri et al. (2008) sledovaly fáze růstové křivky grampozitivních a gramnegativních bakterií. Kmen *Listeria innocua* ATCC 51742 reprezentoval grampozitivní bakterie a kmen *Escherichia coli* ATCC 25922 gramnegativní. Bakteriální buňky byly přeneseny ze zmraženého stavu na „tryptic soy agar“ (TSA), kde byly kultivovány při 37 °C. Po 24 hodinách byla inokulována jedna dobře izolovaná kolonie do 100 ml bujónu z hovězího srdce a mozku. Inkubace probíhala za aerobních podmínek při 37 °C. Studie ukázala, že vybrané druhy se nacházely po 3 hodinách v lag-fázi, po 7 hodinách v exponenciální fázi a po 24 hodinách ve stacionární fázi.

V naší studii byly předmětem výzkumu buňky kvasinek. Eukaryontní buňka prochází narozením od prokaryontní buňky mitózou, která je poměrně složitým, a tudíž i dlouhodobějším procesem než bakteriální amitóza. Generační doba kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* trvá zhruba 90 minut (Kocková-Kratochvílová 1992). Generační doba bakterie *Escherichia coli* je cca 20 minut (Bednář et al. 2009). V jordánské studii se ocitají populace těchto bakterií v jednotlivých fázích růstu v podobném čase jako populace kvasinek v naší studii. Lze se domnívat, že příčinou výrazného zpomalení růstu bakteriální kultury byl relativně malý počet buněk v lag fázi zaočkovaný do většího objemu sledovaného tekutého média.

Held (2011) monitoroval růst kmene *Saccharomyces cerevisiae* „2000 Budvar lager“ za použití multidetekčního hybridního readeru. Kvasinkové kultury byly naočkovány do 50 ml tekutého YPD média a při 30 °C a 125 rpm ponechány růst přes noc. Před započítáním pokusu bylo inokulováno 7,5 ml čerstvého YPD bujónu 150 µl kvasinkové suspenze z přesnoční kultury. Naočkované médium bylo pipetováno na mikrotitrační destičky. Inokulované médium bylo měřeno po dvouminutových intervalech za kontinuálního orbitálního míchání multidetekčním hybridním readerem. Lag-fáze trvala zhruba 3 h. Exponenciální fáze nastala po 4 hodinách a probíhala po dobu 3,5 hodin. Zhruba po 8 h od inokulace nastala stacionární fáze a po 20 h byl experiment ukončen ve fázi odumírání kvasinkové kultury.

V naší studii dosáhla většina druhů kvasinek rodu *Candida* poloviny exponenciální fáze zhruba za 8 h a počátku stacionární fáze cca za 24 h. Můžeme odhadovat, že tato prodleva byla způsobena větším objem živného média, do kterého byly kandidy v rámci experimentu naočkovány. Je také možné, že YDP bujón je pro množení kvasinek vhodnější vzhledem obsahu glukózy než RPMI použité v naší studii.

## **4.2 PRODUKCE BIOMASY A HMOTNOST SUŠINY**

Všechny fáze růstové křivky mikroorganismů kromě lag-fáze jsou charakteristické zvyšující se hmotností biomasy až do odumření celé kultury. Tento přírůstek je různý pro jednotlivé druhy kvasinek, ba dokonce pro různé kmeny v rámci jednoho druhu.

Vavrysová (2009) měřila hmotnost kvasinkové biomasy basidiomycetárního druhu *Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-1. Kvasinka byla naočkována do 150 ml specifického produkčního média s obsahem glukózy, síranu amonného, síranu hořečnatého, dihydrofosforečnanu sodného a vody a inkubována při 28 °C na třepačce při 110 rpm. Exponenciální fáze narůstala ve dvou stupních, což je pro basidiomycetární kvasinky produkující karotenoidy charakteristické. Hmotnost sušiny v polovině exponenciální fáze byla 0,004155 g po 48 h od kultivace. Ve stacionární fázi vyprodukovala kvasinková kultura 0,011025 g sušiny po 100 h od kultivace.

Jankeje (2007) sledovala produkci biomasy basidiomycetární karotenoidní kvasinky, *Phaffia rhodozyma*. Do 400 ml specifického produkčního média s přídavkem močoviny bylo inokulováno 80 ml kvasinkové kultury. Naočkováná kvasinková kultura byla inkubována při 19 °C a 90 rpm. Bylo zjištěno, že *Phaffia rhodozyma* dosahuje poloviny exponenciální fáze po 49,5 h po kultivaci při hmotnosti sušiny asi 0,007 g v 1,5 ml živného média. Stacionární fáze započala po 90 h při hmotnosti narostlé sušiny 0,0082 g.

V naší studii dosahovaly askomycetární kvasinky rodu *Candida* exponenciální i stacionární fáze mnohem dříve než sledované diskutované dva druhy basidiomycetárních kvasinek. Dále byly v naší studii zjištěny průměrně sedminásobně nižší hodnoty hmotnosti sušiny v polovině exponenciální fáze a asi pětinasobně nižší na počátku stacionární fáze. Kultivační podmínky jako teplota vyšší jen o 2 °C nebo nižší počet rpm nehrály v kinetice jejich růstu zřejmě významnou roli. Tyto výsledky zřejmě ukazují na fakt, že perfektní stádia basidiomycetárních kvasinek dovedou účinněji hospodařit s živinami než imperfektní stádia askomycetárních kvasinek, a přežívají tudíž delší dobu s větším přírůstkem hmotnosti biomasy.

## **4.3 KONCENTRACE $\beta$ -GLUKANU**

Americká studie Mennink-Kersten et al. (2006) ukázala, jaké koncentrace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanu vylučují do prostředí vláknitá imperfektní stádia patogenních askomycet. Byl sledován druh *A. fumigatus*. Ke kultivaci byl použit bujón s YNB a koncentracemi glukózy 5, 25 a 100 mmol. Kultury *A. fumigatus* byly inkubovány nejvýše 9 dní při 37 °C a 160 rpm.



Inkubace probíhala do koncentrace konidií v médiu  $10^6$  -  $10^7$  spor/ml. Měření probíhalo ve 200 ml média, z něhož bylo odebíráno mycelium filtrací kultury a poté vysušeno mrazem pro měření hmotnosti sušiny. Mycelium bylo odebíráno po v okamžiku iokulace, dále po 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24, 32 a 40 h. Taktéž byl odebírán vzorek média pro měření vyloučeného  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanu. Toto médium bylo mnohonásobně zředěno a přítomnost  $\beta$ -glukanu detekována pomocí soupravy Fungitell. Během růstu na YNB došlo k poklesu pH. Při metabolismu glukózy totiž vznikají organické kyseliny, kterých se houba zbavuje vyloučením do prostředí. Během lag-fáze úbytek glukózy koreloval s produkcí biomasy. Koncentrace glukózy dosáhla nulové hodnoty po 17 h v médiu s koncentrací glukózy 5 mmol, po 24 h v médiu s koncentrací glukózy 25 mmol a za 72 h v médiu s koncentrací glukózy 100 mmol. Hmotnost sušiny dosahovala maximálně 0,0006 g až 0,00075 g v 1,5 ml média, čehož bylo ve většině případů dosaženo za 17 h. Nízká koncentrace glukózy je pro růst *Aspergila* limiující a započíná fázi odumírání. Devět dní po úplné spotřebě glukózy vypadalo mycelium zcela odumřelé ve všech kulturách. Po přenesení na čerstvé médium však opět zregenerovalo a začalo růst.  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukan dosahoval koncentrací 213,4 pg/l v okamžiku kultivace, 827,6 pg/ml po 2 h, 527 pg/ml po 4 h, 727,4 pg/ml po 6 h, 1 278,5 pg/ml po 8 h, 3 274,2 pg/ml po 10 h, 7 278,1 pg/ml po 12 h, 6 773 pg/ml po 14 h, 11 282 pg/ml po 16 h, 15 791 pg/ml po 18 h, 58 914,9 po 24 h, 58 914,9 po 32 h a 53 904, 9 pg/ml po 40 h. Po 24 hodinách byl zaznamenán významný pokles  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanu, ale nikoli v důsledku deficitu glukózy.

Tento pokles zjistili i Miyazaki et al. (1995) u *Candida albicans*. Předpokládali, že je tento pokles způsoben enzymem  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanázou. Většina studovaných kvasinek produkovala  $\beta$ -glukan v různé míře. Stejní autoři změřili maximální koncentraci  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanu u druhu *Aspergillus fumigatus* asi 10 000 pg/ml při teplotě 30 °C. *A. fumigatus* produkoval mimo jiné i exocelulární  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanázu. Tento enzym byl zjištěn i u jiných hub. Zřejmě hraje důležitou roli v katabolické hydrolyze extracelulárních  $\beta$ -glukanů. Pravděpodobně se exprimuje v prostředí s klesající koncentrací glukózy, aby rozštěpila polymerní  $\beta$ -glukan na molekuly glukózy, které jsou pro houbu snadno dostupné. Pokud by totiž došlo k vyčerpání glukózy, mycelium houby by se rozpadlo.  $\beta$ -glukan je dle hypotézy autorů do prostředí vylučován zřejmě také jako rezerva zdroje energie.

Naše studie ukázala, že většina studovaných druhů kvasinek produkovala  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukan v různé míře. Výrazný vzestup koncentrace  $\beta$ -glukanu byl zaznamenán ve stacionární fázi u *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. albicans* a *C. guilliermondii*, nad 5000 pg/ml.

U ostatních druhů je patrný vzestup méně výrazný až nevýrazný. Některé kmeny dokonce vykazovaly mírný pokles koncentrace  $\beta$ -glukanu. U všech kmenů *C. fabianii* a u kmene *C. parapsilosis* 11-15 byly koncentrace  $\beta$ -glukanu tak nízké, že vycházely pod kalibrační křivkou detekovatelnosti.

Při srovnání naší studie lze říci, že se produkce  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanu u kvasinek rodu *Candida* a u vláknitých hub druhu *A. fumigatus* v polovině exponenciální fáze shoduje pouze u druhu *C. kefyr*. *C. kefyr* je, jak vyplývá ze statistického hodnocení, v produkci  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanu nejslabší. Ve stacionární fázi však *A. fumigatus* produkuje mnohem více  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanu než všechny sledované druhy kandid. Tento rozdíl koncentrací je vyšší než 30.000 pg/ml. U některých kmenů kvasinek byl zaznamenán pokles koncentrace, ale u jiných nikoli. Zřejmě se tak stalo z toho důvodu, že detekce  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanu v naší studii probíhala pouze ve dvou fázích, kdežto v citovaných studiích byla jeho koncentrace měřena soustavně po celou dobu růstu studovaného organismu.

#### **4.4 ANALÝZA DAT**

Statistické hodnocení pomocí korelačních koeficientů Spearmanova a Pearsonova ukázalo, že produkce sušiny nekoreluje s produkcí  $\beta$ -glukanu. Pouze u druhu *C. dubliniensis* ve stacionární fázi vyšla tato korelace signifikantní.

Pomocí statistických metod One-way ANOVA a Tukey-Kramerův test bylo zjištěno, že hodnoty koncentrací  $\beta$ -glukanu u všech kmenů druhu *C. dubliniensis* v obou fázích růstu výrazně převyšovaly hodnoty koncentrací ostatních druhů testovaných kvasinek. Tato kvasinka tedy produkuje výrazně více  $\beta$ -glukanu než *C. albicans*. Bylo by proto bylo vhodné ověřit, zda je tento výrazný rozdíl patrný i ve statisticky významnějším souboru kmenů *C. albicans* a *C. dubliniensis*. Nejnižších detekovatelných koncentrací  $\beta$ -glukanu dosahovala *C. kefyr*. Podprahovou koncentrací ve stacionární i exponenciální fázi růstu  $\beta$ -glukanu měla *C. fabianii*. Experimentálně byl kmen *C. fabianii* ATCC zředěn pouze 10x. Bylo zjištěno, že je v této koncentraci detekovatelný. Po 8 h byla koncentrace  $\beta$ -glukanu 656,0733 pg/ml a po 24 h 609,58 pg/ml. Zůstává nezodpovězenou otázkou, jaká je produkce  $\beta$ -glukanu u druhů *C. utilis* a *C. pelliculosa*, které jsou od *C. fabianii* odlišitelné pouze molekulárními metodami.

## 5. ZÁVĚR

Hlavním cílem této studie byla detekce a kvantifikace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanu u 50 kmenů deseti lékařsky nejvýznamnějších druhů kandid pomocí standardizované komerční soupravy Fungitell.

Na základě provedených experimentů lze učinit následující závěry:

Souprava Fungitell, kterou lze detekovat  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukan, je velmi vhodným diagnostickým testem, jímž lze prokázat i počínající kvasinkovou infekci. Jedná se o standardizovaný komerční kit a lze ho doporučit i přes vyšší cenu a technicky náročnější postup. Reagencie soupravy Fungitell se musí přesně pipetovat ve velmi malých objemech, metoda je citlivá ke kontaminaci glukánem či endotoxinem, a proto je nutné používat speciálních laboratorních potřeb, které neobsahují ani stopové množství těchto látek, které by mohly ovlivnit výsledky.

RPMI bujón se zdá být ideálním médiem pro studium detekce  $\beta$ -glukanu kvasinkami. Neobsahuje glukany ani endotoxin a obsahem bílkovin do jisté míry simuluje krevní plazmu.

Bylo zjištěno, že průběh růstových křivek u studovaných druhů kandid se významně neliší. V polovině exponenciální fáze se většina studovaných druhů ocitla zhruba po 8 hodinách. Po 24 hodinách byl zaznamenán počátek stacionární fáze.

Hmotnost sušiny testovaného souboru kvasinek se v polovině exponenciální fáze pohybovala okolo 1 mg a na počátku stacionární fáze kolem 1,7 mg

V exponenciální fázi růstu je  $\beta$ -glukan detekovatelný u většiny kmenů při stonásobném ředění, avšak v některých případech při desetinásobném zředění vzorku. Na počátku stacionární fáze je jeho koncentrace u devíti z deseti druhů detekovatelná při stonásobném ředění vzorku.

Nejnižší produkce byla zaznamenána u *C. fabianii*, jejíž všechny testované kmeny v obou fázích dosahovaly hodnot koncentrace  $\beta$ -glukanu pod prahem detekovatelnosti. Ředění séra při podezření na systémovou infekci touto kvasinkou je nutné provést 10x a nikoli 100x jako u ostatních devíti druhů testovaných lékařsky významných druhů kvasinek. Nízkých hodnot koncentrací při stonásobném ředění dosahuje v obou fázích *C. kefyr*, u které je pravděpodobné, že některé její kmeny mohou při stonásobném ředění také dosahovat podprahových hodnot koncentrace  $\beta$ -glukanu. Kmen *C. parapsilosis* 11-15 lze ale považovat za výjimku. V exponenciální fázi rovněž dosahuje při stonásobném ředění podprahových hodnot koncentrací detekovaného markeru narozdíl od ostatních kmenů tohoto druhu

kvasinky. Ve stacionární fázi jsou však u zmíněného kmene tyto hodnoty měřitelné i při ředění 100x.

Z výsledků této studie vyplývá že hmotnost kvasinkové biomasy nevykazuje signifikantní korelaci s hmotností produkovaného  $\beta$ -glukanu v exponenciální ani ve stacionární fázi.

## 6. PŘEHLED LITERATURY

**Adachi, Y. et al. (1989):** Physicochemical properties and antitumor activities of chemically modified derivatives of antitumor glucan „grifolan LE“ from *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) **37**:1837-1843

**Al-Qadiri, H.M. et al. (2008):** Studying of the bacterial growth phases using fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *The Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, **16**: 73–89

**Alberts, B. et al. (2005):** Základy buněčné biologie 2. vydání, Ústí nad Labem, Espero Publishing, 740 stran, ISBN-10: 80-902906-2-0

**Asada, Y. et al. (1982):** Plant infection: *The physiological and biochemical basis Japan scientific societies press, Tokyo and Springer Verlag, Berlin*, 362 stran, ISBN 4762253359

**Avni, T. et al. (2010):** PCR diagnosis of invazive candidiasis: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*, **49(2)**: 665–670

**Bednář, M. et al. (2009):** Lékařská mikrobiologie Triton, Praha, 560 stran, ISBN: 80-2380-297-6

**Bell, W. et al. (1992):** *Pythium aphanidermatum*: culture, cell wall composition and isolation and structure of antitumour storage and solubilised cell wall (1→3), (1→6)-β-D-glucans. *Carbohydr. Res.*, **231**: 293-307

**Bhally, H.S. et al. (2006):** Infection in a neonate caused by *Pichia fabianii* importance of molecular identification. *Medical Mycology*, **44**: 185 - 187

**Buchta, V. et al. (2010):** Nepodkročitelné minimum laboratorní diagnostiky invazivních mykotických infekcí – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM JEP. *Postgraduální medicína*, **12** (příloha 5)

**David, M. (2007):** Studium cytoskeletu a ultrastrukturální charakteristika vybraných patogenních kvasinek – *Malassezia pachydermatis* a *Cryptococcus laurentii*, Disertační práce LF MU v Brně, rok obhajoby 2007

**Deslandes, Y. et al. (1980):** Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. Part. 13 Triple helical structure of (1→3)-β-D-glucan *Macromolecules*. **13(6)**: 1466–1471

**Dooley, D.P. et al. (1990):** Prostatitis caused by *Hansenula fabianii*. *Journal of Infectious Diseases*, **161**: 1040-1041

**Finkelman, M.A. (2005):** (1,3)-β-D-glucan: Biological properties and implications for LAL testing. *LAL Update (ACC)*. **22 (2)**: 1-6

**Fleet, G.H. (1991):** Cell walls: In **Rose, A. et Harrison, J.S.** *The Yeasts: Yeast's organelles* Academic Press, London, **4**: 199–277

- Fragner, P. (1984):** Malá lékařská mykologie Avicenum, Praha, 192 stran, ISBN 08-004-84
- Fragner, P. (1992):** Určování kvasinek izolovaných z lidského organismu Academia, Praha, 82 stran, ISBN 80-200-0011-9
- Friend, J. et Threlfall, D.R. (1976):** Biochemical aspects of plant-parasite relationships Academic Press London
- Fučíková, T. et Bartůňková, J. (1994):** Základy klinické imunologie RDI Press, Praha, 149 stran, ISBN: 80-90067-4-3
- Gilfillan, G.D. et al. (1995):** *Candida dubliniensis*, phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology*, **144**: 829-838
- Girouard, G.G. et al. (2007):** Observations of (1→3)-β-D-glucan detection as a diagnostic tool in endemic mycosis caused by *Histoplasma* or *Blastomyces*. *J Med Microbiol*, **56(Pt 7)**: 1001-1002
- Haber, J. (1995):** Systémové mykózy a jejich léčba Galén, Praha, 320 stran, ISBN 80-85824-16-7
- Hamal, P. et al. (2008):** A case of endokarditis caused by the yeast *Pichia fabianii* with biofilm production and developed *in vitro* resistance to azoles in the course of antifungal treatment. *Medical Mycology* **46**: 601-605.
- Heinfuss, R. et Williams, P.H. (1976):** Physiological plant pathology vol. 4. Springer-Verlag, Berlin (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series)
- Held, P. (2011):** Monitoring růstu pivních kvasinek při výrobě piva a použití readeru synergy H1 pro přesné a kvalitní stanovení kinetických informací o růstu kvasinkových kultur, *Chemagazín*, **21(5)**: 24-25
- Hugo, J. et al. (2009):** Velký lékařský slovník 8. vydání Maxdorf, Praha, 1144 stran, ISBN 978-80-7345-166-0
- Janderová, B. et Bendová, O. (1999):** Úvod do biologie kvasinek 1. vydání, Karolinum, Praha, 108 stran, ISBN 80-7184-990-1
- Jankeje, K. (2008):** Produkce metabolitů vybranými kmeny průmyslových kvasinek v průběhu různých fází buněčného růstu, Bakalářská práce, Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická VUT v Brně, rok obhajoby 2008
- Jedličková, A. (2006):** Systémové mykózy Maxdorf, Praha, 130 stran, ISBN 80-7345-101-8
- Jeřábková, P. (2006):** Studium vlastností biologického materiálu pomocí metod obrazové analýzy, Pojednání k disertační práci, Fakulta chemická VUT v Brně, rok obhajoby 2006
- Jezequel, V. (1998):** Curdlan: A new functional β-glucan. *Cereal Foods World*, **43(5)**: 361-364

- Kamiyama, A. et al. (1989):** Adansonian study of *Candida albicans*: intraspecific homogeneity excepting *C. stellatoidea* strains. *Journal of Med Vet Mycol* **27**: 229-241
- Kanda, H. et al. (2001):** Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-beta-D-glucan level. *Kidney Int.* **60(1)**: 319-323
- Kaprálek, F. (1999):** Mikrobiologické praktikum Karolinum, Praha, 54 stran, ISBN 8071849278
- Kato, A. et al. (2001):** Elevation of blood (1→3)-beta-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron*, **89**: 15–19
- Kim, Y.T. et al. (2000):** Structural characterization of  $\beta$ -D-(1→3, 1→6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **328(3)**: 331–341
- Kocková-Kratochvílová (1982):** Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy 1. vydání Alfa, Bratislava, 488 stran, ISBN 63-154-82
- Kocková-Kratochvílová, A. (1990):** Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov 1. vyd. Alfa, Bratislava, 704 stran, ISBN 80-05-00644-6
- Kocková-Kratochvílová, A. (1990):** Yeast and yeast-like organisms VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 546 stran, ISBN 3-527-26162-1
- Kocmanová, I. et al. (2007):** Laboratorní stanovení 1,3- $\beta$ -D-glukanu a jeho využití v diagnostice invazních mykóz. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, **14(3)**:88–92
- Kogan, G. (2000):** (1→3, 1→6)- $\beta$ -D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. In: Atta-ur-Rahman. *Studies in Natural Products Chemistry*, **23**:107–151
- Kollar, R. et al. (1997):** Architecture of the cell wall  $\beta$ -(1→6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$ -(1→3)-glucan, and chitin. *J. Biolog. Chem.* **272(28)**: 17762–17775
- Kopecká, M. et al. (2001b):** Cytoskeleton in human pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Aureobasidium pullulans* and the effect of cytoskeletal inhibitors. *Eur J Cell Biol* **80**: 303-311
- Koukalová, D. et al. (2011):** Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie II 2. vydání, UP Olomouc, 128 stran, ISBN-13: 978-80-244-2964-9
- Kraske, E.M. (1996):** Kandidóza: přirozená léčba onemocnění způsobeného kvasinkami 1. vydání, Praha : Informatorium, 93 stran, ISBN 80-86073-00-9
- Kubišta, V. (1998):** Základní pochody buněčných dějů Scientia, Praha, 210 stran, ISBN 80-7183-109-3
- Kucharíková, S. et al. (2011):** Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J Med Microbiol.*, **60(Pt 9)**: 1261-1269

- Kurtzman, C.P. et Fell, J.W. (1998):** The yeasts, a taxonomic study Elsevier Science B.V., Amsterdam, stran, ISBN 0-444-81312-8
- Lindgren, C.C (1949):** The yeast cell, its genetics and cytology Educational Publishers, St. Louis
- Lengerová, M. et al. (2009):** Úloha PCR v diagnostice invazivní aspergilózy. *Postgraduální medicína*, **15(S4)**: 43-47
- Maartens, G. et Wood, M.J. (1991):** The clinical presentation and diagnosis of invasive fungal infection. *J Antimicrob Chemother.* **28 (A)**:13-22
- Madigan, M.T. et al. (2012):** Brock Biology Of Microorganisms: global edition. 13th edition, Pearson, Boston,1150 stran, ISBN 978-0-321-73551-5
- Manners, D.J. et al. (1973):** The structure of a (1→3)-β-D-glucan from yeast cell walls. *Biochemistry.* **135**:19–30
- Manners, D.J. et Sturgeon, R.J. (1982):** Reserve carbohydrates of algae, fungi and lichens: In Encyclopedia of plant physiology new series, vol. 13A Eds. Springer-Verlag, New York, 472–514
- Mennink-Kersten, M.A. et Verweij, P.E. (2006):** Non-culture-based diagnostics for oportunistc fungi. *Infect Dis Clin*, **20**: 711–727
- Mennink-Kersten, M.A. et al. (2006):** In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*, **44(5)**: 1711-1718
- Mennink-Kersten, M.A. et al. (2007):** Reactivity of bacteria with the 1,3-beta-glucan assay (Paper M-568). *Abstract of the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17-20, Chicago, IL, USA: American Society for Microbiology
- Mitsuya, M. et al. (1994):** In vitro studies on the release of G Testpositive (1-3)-β-D-glucan from various fungal pathogens: In Commitee on organic dusts. *Rylander, R. and Goto, H. editors.* **94(1)**: 29-37
- Miyazaki, T. et al. (1995):** (1→3)-beta-d-glucan in culture fluid of fungi activates factor G, a limulus coagulation factor. *J Clin. Lab Anal.*, **9**: 334-339
- Misaki, A. et al. (1981):** Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate – modified, branched (1→3)-β-D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1→3)-glycosidic linkages. *Carbohydr. Res.*, **92**: 115–129
- Mohr, J. et al. (2005):** A prospective pilot survey of B-glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168
- Němec, M. et Horáková, D. (1999):** Základy mikrobiologie 3. vydání, Př F MU v Brně, 233 stran, ISBN 80-210-2060-1



- Nichterlein, T. et al. (2003):** Comparison of glucan detection and galactomannan enzyme immunoassay in gastrointestinal and systemic murine candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **46(2)**: 103–108
- Obayashi, T. et al. (1992):** Determination of plasma (1→3)-β-D-glucan: a new diagnostic aid to deep mycosis. *J Med Vet Mycol.*, **30(4)**:275–280
- Obayashi, T. et al. (1995):** Plasma (1→3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *The Lancet* **345(8941)**:17–20
- Odabasi, Z. et al. (2004):** Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cut-off development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis.***39(2)**: 199–205
- Odabasi, Z. et al. (2006):** Differences in beta-glucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. *Med Mycol.*, **44**: 267-272
- Ogawa, M. et al. (2004):** False positive plasma (1→3)-beta-D-glucan following immunoglobulin product replacement in adult bone marrow recipient. *Int. J. Hematol.*, **80**: 97-98
- Olafsdottir, E.S. et Ingolfsdottir, K. (2001):** Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. *Planta Med.* **67(3)**: 199–208
- Otčenášek, M. et al. (1990):** Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních Avicenum, Praha, 155 stran, ISBN 80-201-0059-8
- Percival, E. et McDonell, R.H. (1967):** Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides Academic Press, New York
- Pickering, J.W. et al. (2005):** Evaluation of a (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections *J Clin Microbiol.*, **43(12)**: 5957–5962
- Procházka, S. et al. (1998):** Fyziologie rostlin Academia, Praha, 488 stran, ISBN 80-200-0586-2
- Rosa, C. et Péter, G. (2006):** Biodiversity and ecofysiology of yeasts (The yeasts handbook), Springer, ISBN 3-540-26100-1
- Rose, A.H. et Harrison, J.S. (1991):** The yeasts: Biologie of yeasts Academic Press, London
- Saito, H. et al. (1991):** Relationship between conformation and biological response for (1→3)-β-D-glucans in the activation of coagulation factor G from *Limulus* amebocyte lysate and host-mediated antitumor-activity-demonstration of single-helix conformation as a stimulant *Carbohydr. Res.* **217**: 181–190
- Smits, G.J. et al. (1999):** Cell wall dynamics in yeasts. *Curr Opin Microbiol.*, **2**: 348–352
- Sone, Y. et al. (1978):** Isolation and characterization of polysaccharides of „Kikurage,“ fruit body of *Auricularia auricula-judae*. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 417–425

- Stone, B.A. et Clarke A.E. (1992):** Chemistry and biology of (1-3)- $\beta$ -glucan La Trobe University Press, Melbourne, ISBN-13: 9780080920542
- Sullivan, D.J. et al. (1996):** Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *J Med Microbiol*, **44**: 399 - 408.
- Szaniszlo, P.J. et al. (1985):** Fungal dimorphism, with emphasis on fungi pathogenic for humans. Plenum Press, New York-London, 395 stran
- Šilhánková, L. (2002):** Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii Academia Praha, 364 stran, ISBN 978-80-200-1703-1
- Tanaka, S. et al. (1991):** Activation of a *Limulus* coagulation factor G by (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans. *Carbohydrate Res.*, **218**:167-174
- Tomšíková, A. et Šandula J. Imunologie a patogenita:**In **Kocková-Kratochvílová, A et al. (1986).** Kvasinky ve výzkumu a praxi 1. vydání, Academia Praha, 379 stran, ISBN 21-023-86
- Tvrdoň, M. et Bálešová, B. (1986):** Kvasná mikrobiologie 1. vydání Státní nakladatelství technické literatury, Praha, 167 stran, ISBN 04-836-86
- Tyčová, M. (2010):** Molekulárně genetická diferenciacie lékařsky významných kvasinek rodu *Pichia*. Diplomová práce, Katedra buněčné a molekulární biologie Př F UP v Olomouci, rok obhajoby 2010
- Usov, A.I. (1993):** Oligosaccharides—a new class of signaling molecules in plants. *Uspekhi Khimii* **62(11)**: 1119-1144
- Valenza, G. et al. (2006):** Identification of *Candida fabianii* as a cause of lethal septicaemia. *Mycoses* **49**: 331 - 334.
- Vavrysová, A. (2009):** Produkce karotenoidů kvasinkami rodu *Cystofilobasidium*, Diplomová práce, Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická VUT v Brně, rok obhajoby 2009
- Voet, D. et Voet, J.G. (2011):** Biochemistry 3. vydání. John Wiley & Sons, New York city, 235 stran, ISBN 9781118008140
- Votava, M. (2003):** Lékařská mikrobiologie speciální 1. vydání, Neptun, Brno, 495 stran, ISBN-10: 80-902896-6-5
- Welhoener, U. et Geiger, E. (2003):** Definition of the physiological condition of a brewers yeast by means of enzyme activity measurements during propagation and fermentation. *Proc. Int. Congress Eur. Brew. Conv.*, Contribution 55, Dublin, Ireland
- Winsor, B. et Schiebel, E. (1997):** An overview of the *Saccharomyces cerevisiae* microtubule and microfilament cytoskeleton. *Yeast* **13**: 399-434
- Xu, H. et al. (2006):** The alpha-amino adipate pathway for lysine biosynthesis in fungi. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **46**: 43-64

**Yoshioka, S. et al. (1998):** Immunotoxicity of soluble  $\beta$ -glucans induced by indomethacin treatment. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40(5)**: 1221-1226

**Zekovič, D.B. et al. (2005):** Natural and modified (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology*, **25**: 205-230

**Zinser, E. et Daum, G. (1995):** Overview of subcellular fractionation procedures for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Yeast* **11**: 493-536

<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>

<http://www.ifauna.cz/bezobratli/clanky/r/detail/5257/ostrorepi-zivouci-fosilie/>

[www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au)

[www.mikrobewiky.kenyou.edu](http://www.mikrobewiky.kenyou.edu)

[http://www.geolocation.ws/v/W/File%3ALimulus%20polyphemus%20\(aq.\).jpg/-/en](http://www.geolocation.ws/v/W/File%3ALimulus%20polyphemus%20(aq.).jpg/-/en)

<http://isb-up.cz/data/PDF/HBIO/HBIO02.pdf>

[www.indexfungorum.org/Names/Names.asp](http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp)

<http://people.upei.ca/jlewisMycology-I-2011.pdf>

[gsbs.utmb.edu/microbook/intomyco.htm](http://gsbs.utmb.edu/microbook/intomyco.htm)

<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMicm041054>

<http://www.masterfile.com/stock-photography/image/861-03339435/Candida-albicans-Yeast-colony-from-the-lung-of-an-immunocompromised-patient-PAS-stain.-LM-X100>

## 7. SEZNAMY

### 7.1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CMA .....	kukuřičný agar
CRC .....	Colorex Candida; Trios, ČR
ELISA .....	„enzyme linked immunosorbent essay“
GA .....	agar podle Gorodkové
JA .....	V-8 juice agar
LAL .....	lyzát z amébcytů ostrorepa rodu <i>Limulus</i>
MA .....	mrkvový agar
mCHA .....	modifikovaný Christensenův agar
MOPS pufr.....	pufr 3-( <i>N</i> -morpholino) propansulfonové kyseliny
PAS .....	periodic acid Schiff
PCR .....	polymerázová řetězová reakce
pNA .....	paranitroanilin
RA .....	rýžový agar
rpm .....	otáčky za minutu
SGA .....	Sabouraudův glukózový agar
TCA .....	žlučový agar s taurocholátem
YMA .....	yeast morfology agar
YNB .....	yeast nitrogen base

### 7.2 SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>OBRÁZEK 1.:</b> <i>TRACHYPLEUS TRIDENTATUS</i> (FOTO: MARTINA BALZAROVÁ) .....	38
<b>OBRÁZEK 2.:</b> <i>LIMULUS POLYPHEMUS</i> (FOTO: HANS HILLEWAER).....	38
<b>OBRÁZEK 3.:</b> <i>CANDIDA ALBICANS</i> , MIKRO A MAKROMORFOLOGIE.....	78
<b>OBRÁZEK 4.:</b> <i>CANDIDA DUBLINIENSIS</i> ; MIKRO A MAKROMORFOLOGIE .....	79
<b>OBRÁZEK 5.:</b> <i>CANDIDA GLABRATA</i> ; MIKRO A MAKROMORFOLOGIE.....	80
<b>OBRÁZEK 6.:</b> <i>CANDIDA GULLIERMONDII</i> ; MIKRO A MAKROMORFOLOGIE.....	81
<b>OBRÁZEK 7.:</b> <i>CANDIDA KEFYR</i> ; MIKRO A MAKROMORFOLOGIE .....	82
<b>OBRÁZEK 8.:</b> <i>CANDIDA KRUSEI</i> ; MIKRO A MAKROMORFOLOGIE.....	83
<b>OBRÁZEK 9.:</b> <i>CANDIDA LUSITANIAE</i> ; MIKRO A MAKROMORFOLOGIE.....	84
<b>OBRÁZEK 10.:</b> <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> ; MIKRO A MAKROMORFOLOGIE.....	85
<b>OBRÁZEK 11.:</b> <i>CANDIDA FABIANII</i> ; MIKRO A MAKROMORFOLOGIE .....	86
<b>OBRÁZEK 12.:</b> <i>CANDIDA TROPICALIS</i> ; MIKRO A MAKROMORFOLOGIE .....	87

<b>OBRÁZEK 13.</b> <i>C. ALBICANS</i> ; SLIZNIČNÍ ORÁLNÍ KANDIDÓZA "SOOR" .....	88
<b>OBRÁZEK 14.</b> : LOKÁLNÍ POVRCHOVÉ KANDIDÓZY .....	88
<b>OBRÁZEK 15.</b> : <i>C. TROPICALIS</i> ; ENDOFTALMITIDA .....	89
<b>OBRÁZEK 16.</b> : <i>C. ALBICANS</i> ; INFEKCE PLIC (PAS BARVENÍ, ZVĚTŠENO 100x) .....	89
<b>OBRÁZEK 17.</b> : <i>C. ALBICANS</i> ; KANDIDÉMIE (BARVENÍ GIEMSOU, ZVĚTŠENO 100x).....	89

## **7.3 SEZNAM TABULEK**

<b>TABULKA 1.</b> : CHARAKTERIZACE VYŠETŘOVANÝCH KMENŮ KVASINEK .....	44
<b>TABULKA 2.</b> : ČASOVÉ INTERVALY SLEDOVANÝCH FÁZÍ RŮSTU.....	52
<b>TABULKA 3.</b> : SUCHÁ HMOTNOST BIOMASY KVASINEK V EX A V SF.....	53
<b>TABULKA 4.</b> : KONCENTRACE A HMOTNOST B-GLUKANU V 1,5 ML VZORKU .....	54
<b>TABULKA 5.</b> : HMOTNOST B-GLUKANU NA JEDNOTKU HMOTNOSTI SUCHÉ BIOMASY.....	56

## **7.4 SEZNAM GRAFŮ**

<b>GRAF 1.</b> : RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> ATCC 90018 .....	47
<b>GRAF 2.</b> : RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>CANDIDA KRUSEI</i> ATCC 90878.....	48
<b>GRAF 3.</b> : RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>CANDIDA DUBLINIENSIS</i> 2-35 .....	48
<b>GRAF 4.</b> : RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>CANDIDA FABIANII</i> 4-35 .....	49
<b>GRAF 5.</b> : RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>CANDIDA KEFYR</i> 4-39 .....	49
<b>GRAF 6.</b> : RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>CANDIDA LUSITANIAE</i> 4-34.....	50
<b>GRAF 7.</b> : RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC 90028 .....	50
<b>GRAF 8.</b> : RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>CANDIDA GUILLIERMONDII</i> ATCC 90877.....	51
<b>GRAF 9.</b> : RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>CANDIDA TROPICALIS</i> ATCC 90874 .....	51
<b>GRAF 10.</b> : RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>CANDIDA GLABRATA</i> ATCC 90030 .....	52
<b>GRAF 11.</b> : LINEÁRNÍ ZÁVISLOSTI HMOTNOSTI SUŠINY A HMOTNOSTI BETA-GLUKANU .....	58
<b>GRAF 12.</b> : SROVNÁNÍ DRUHŮ KVASINEK V PRODUKCI BETA-GLUKANU.....	59
<b>GRAF 13.</b> : LINEÁRNÍ ZÁVISLOSTI HMOTNOSTI SUŠINY A HMOTNOSTI BETA-GLUKANU .....	60
<b>GRAF 14.</b> : SROVNÁNÍ DRUHŮ KVASINEK V PRODUKCI BETA-GLUKANU.....	61

## **7.5 SEZNAM SCHÉMAT**

<b>SCHÉMA 1.</b> : PODJEDNOTKY B-GLUKANŮ <b>SCHÉMA 2.</b> : ČÁST B-GLUKANOVÉHO ŘETĚZCE .....	36
<b>SCHÉMA 3.</b> : KASKÁDA AKTIVACE FAKTORU G ZA PŘÍTOMNOSTI ENDOTOXINU .....	39
<b>SCHÉMA 4.</b> : LAL KASKÁDA SPECIFICKÁ PRO B-GLUKAN.....	40

## 8. PŘÍLOHY

**Obrázek 3.** *Candida albicans*, mikro a makromorfologie

**a)** rýžový agar (po 20 h/24 °C)



**b)** Colorex Candida (48 h/37 °C)



**c)** Sabouraudův agar (7 dní/25 °C)





**Obrázek 4.** *Candida dubliniensis*; mikro a makromorfologie

**a)** rýžový agar (po 20 h/24 °C)



**b)** Colorex Candida (48 h/37 °C)

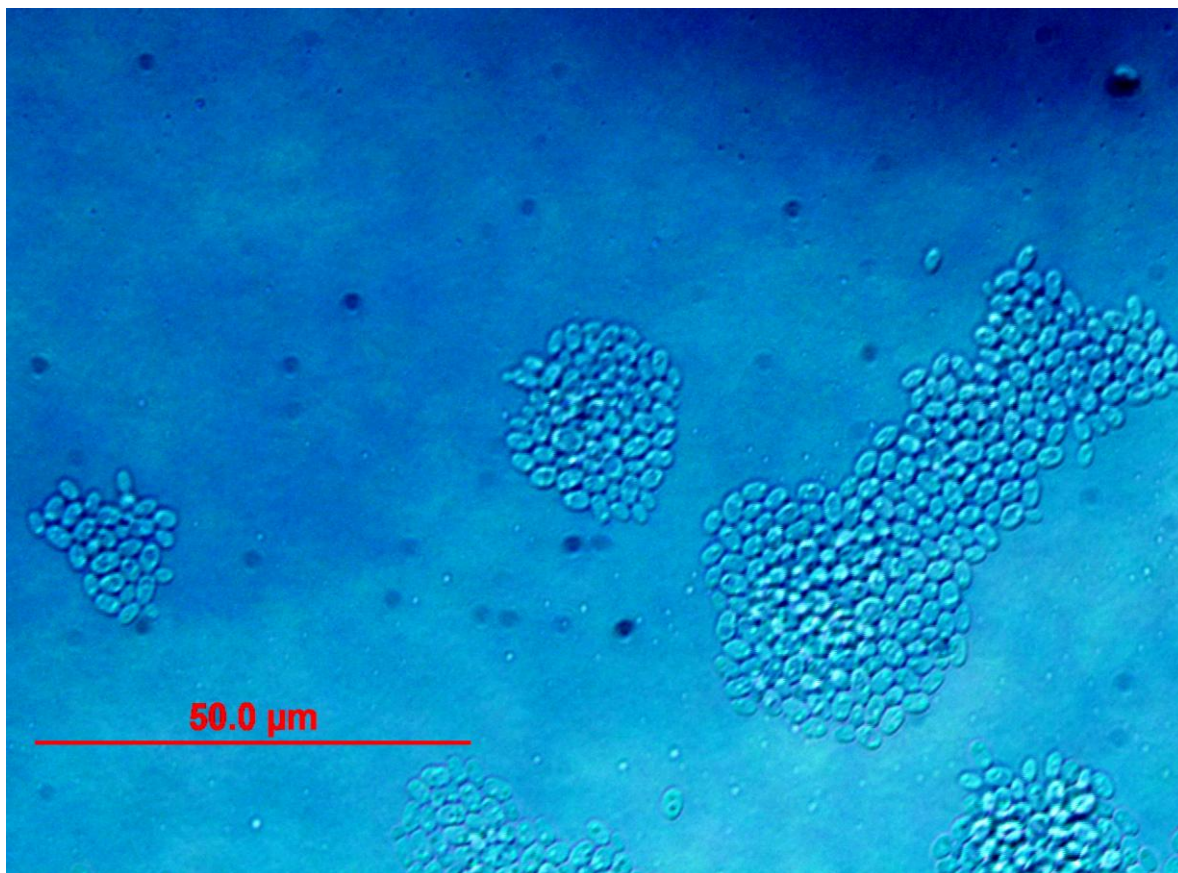


**c)** Sabouraudův agar (7 dní/25 °C)



***Obrázek 5.: Candida glabrata*; mikro a makromorfologie**

**a) rýžový agar (po 20 h/24 °C)**



**b) Colorex Candida (48 h/37 °C)**



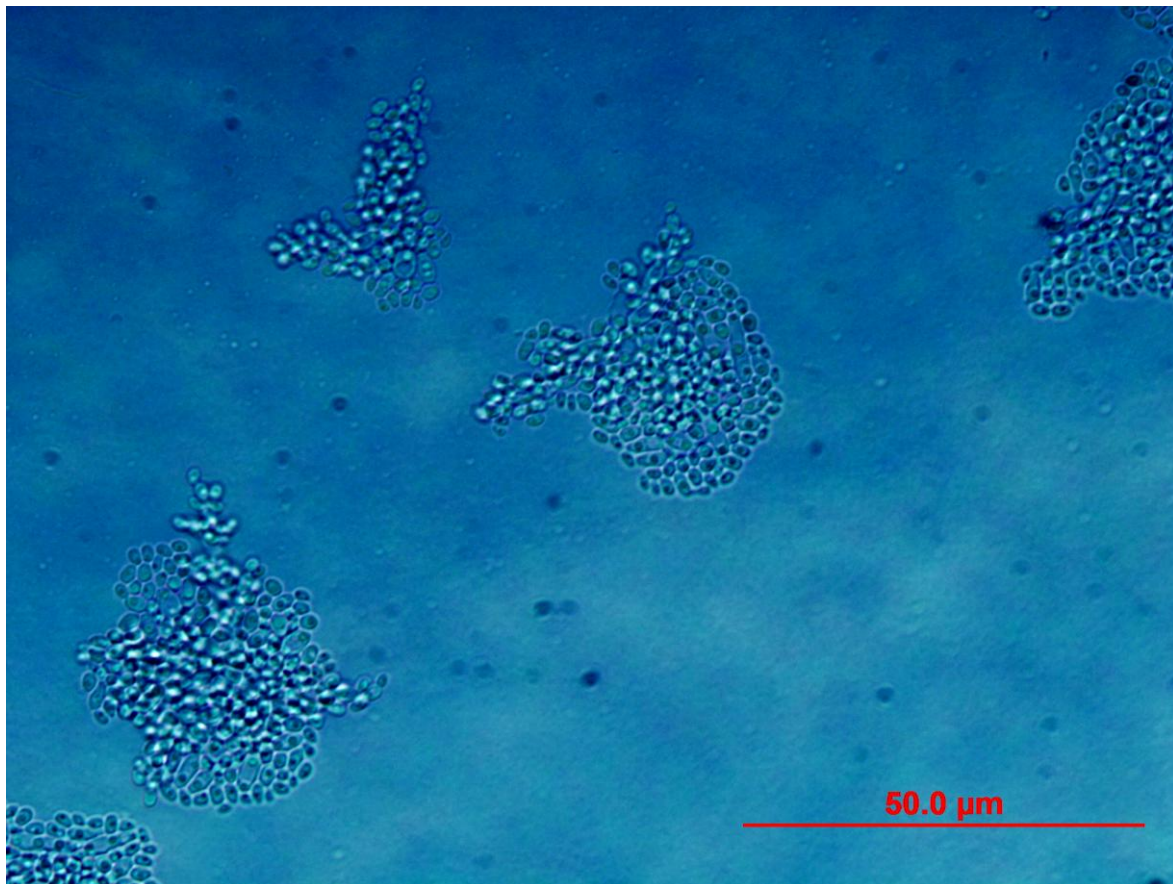
**c) Sabouraudův agar (7 dní/25 °C)**



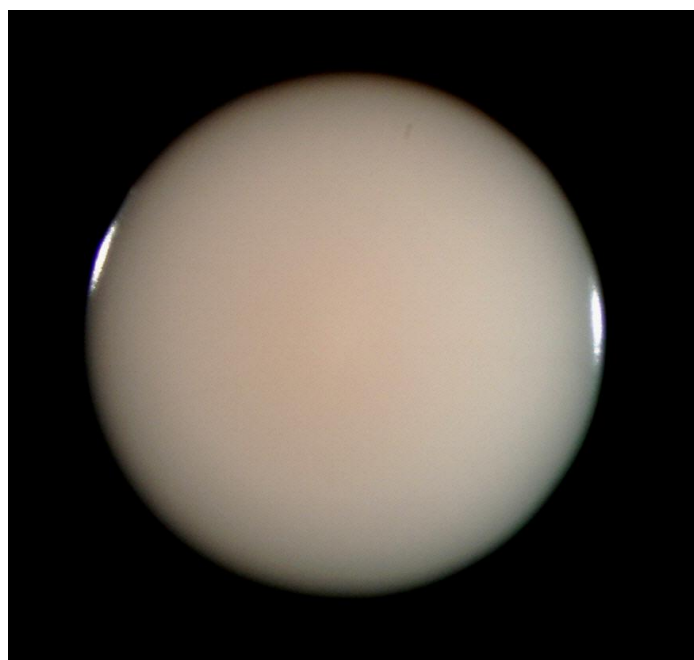


***Obrázek 6.: Candida guilliermondii***; mikro a makromorfologie

**a) rýžový agar** (po 20 h/24 °C)

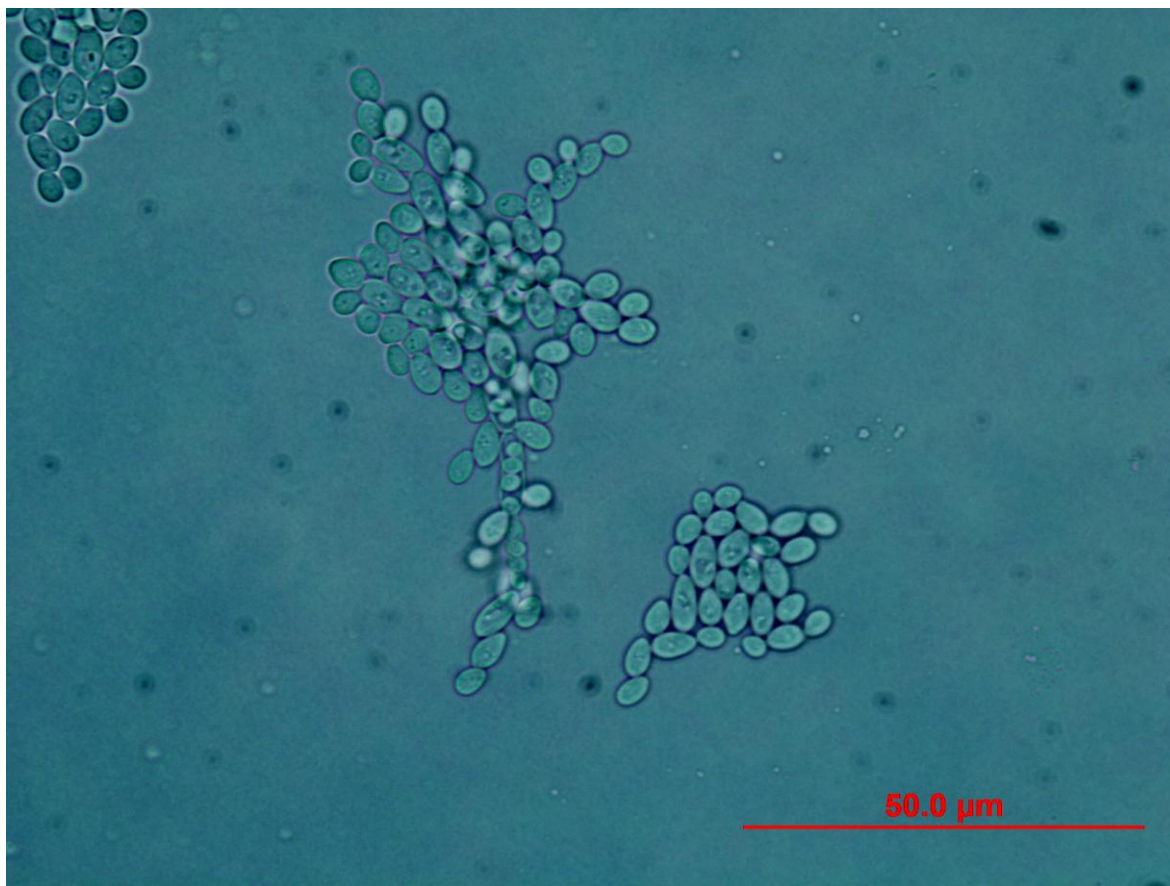


**b) Sabouraudův agar** (7 dní/25 °C)

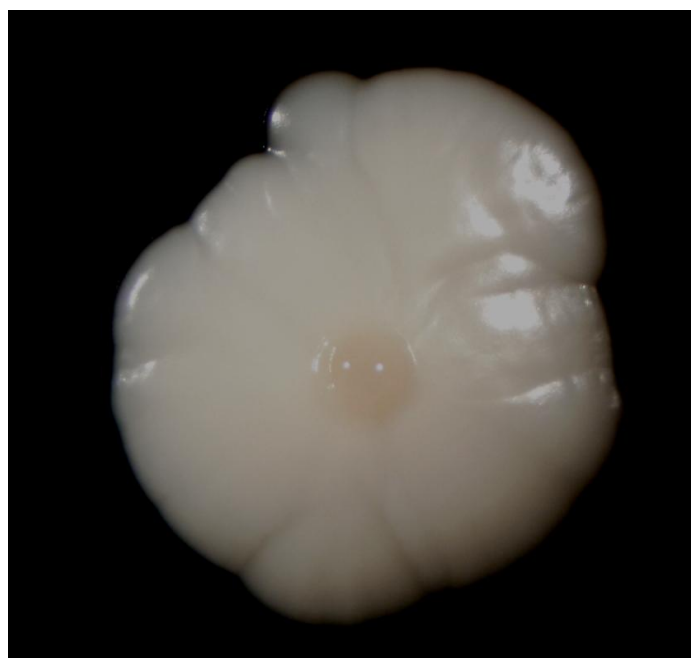


**Obrázek 7.:** *Candida kefyr*; mikro a makromorfologie

**a) rýžový agar** (po 20 h/24 °C)

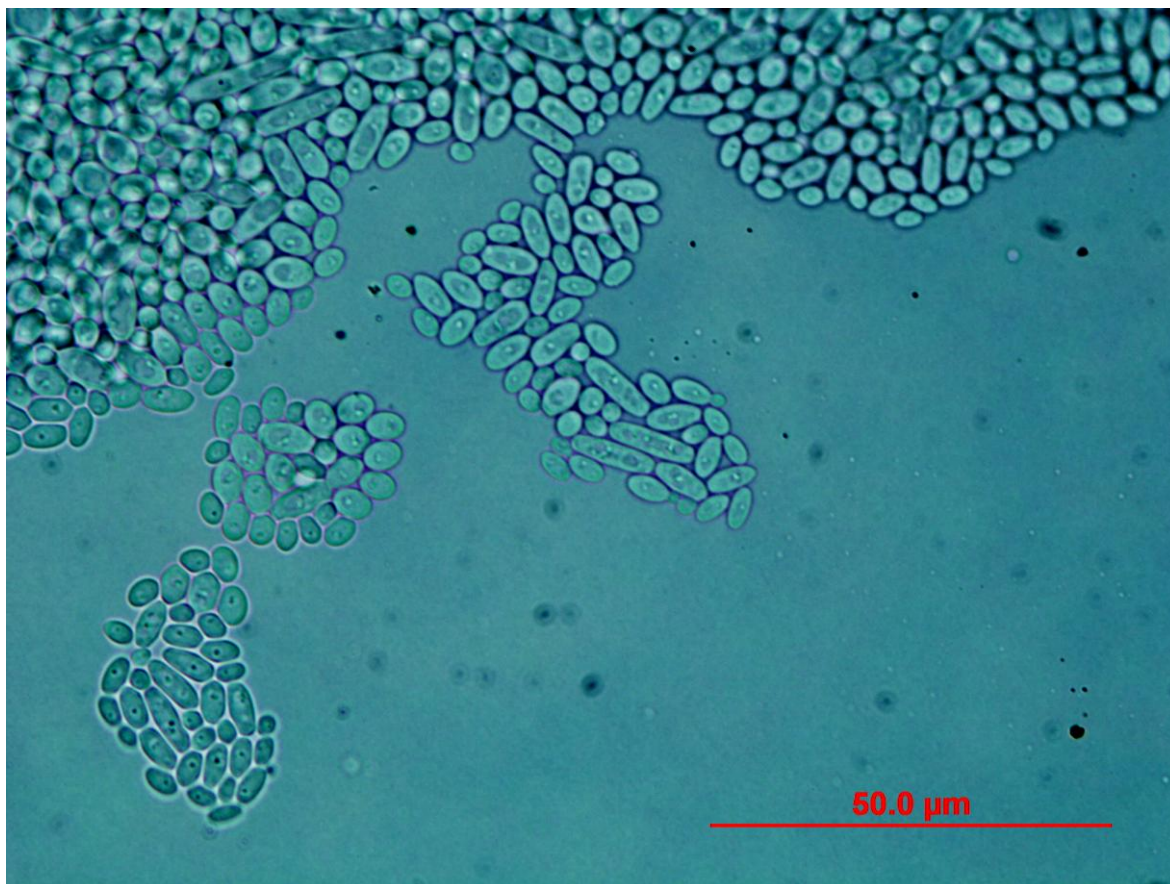


**b) Sabouraudův agar** (7 dní/25 °C)



**Obrázek 8.: *Candida krusei*; mikro a makromorfologie**

**a) rýžový agar (po 20 h/24 °C)**



**b) Colorex Candida (48 h/37 °C)**



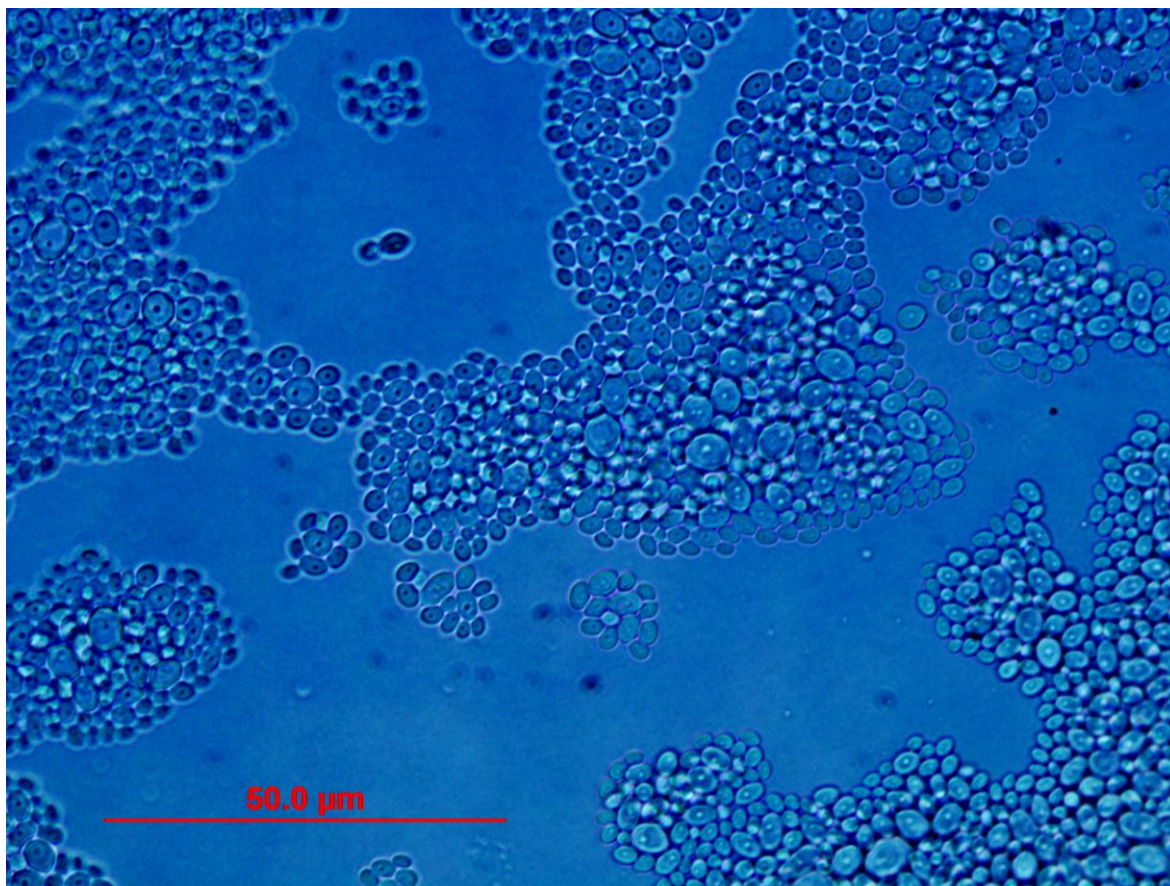
**c) Sabouraudův agar (7 dní/25 °C)**





**Obrázek 9.** *Candida lusitaniae*; mikro a makromorfologie

**a) rýžový agar** (po 20 h/24 °C)

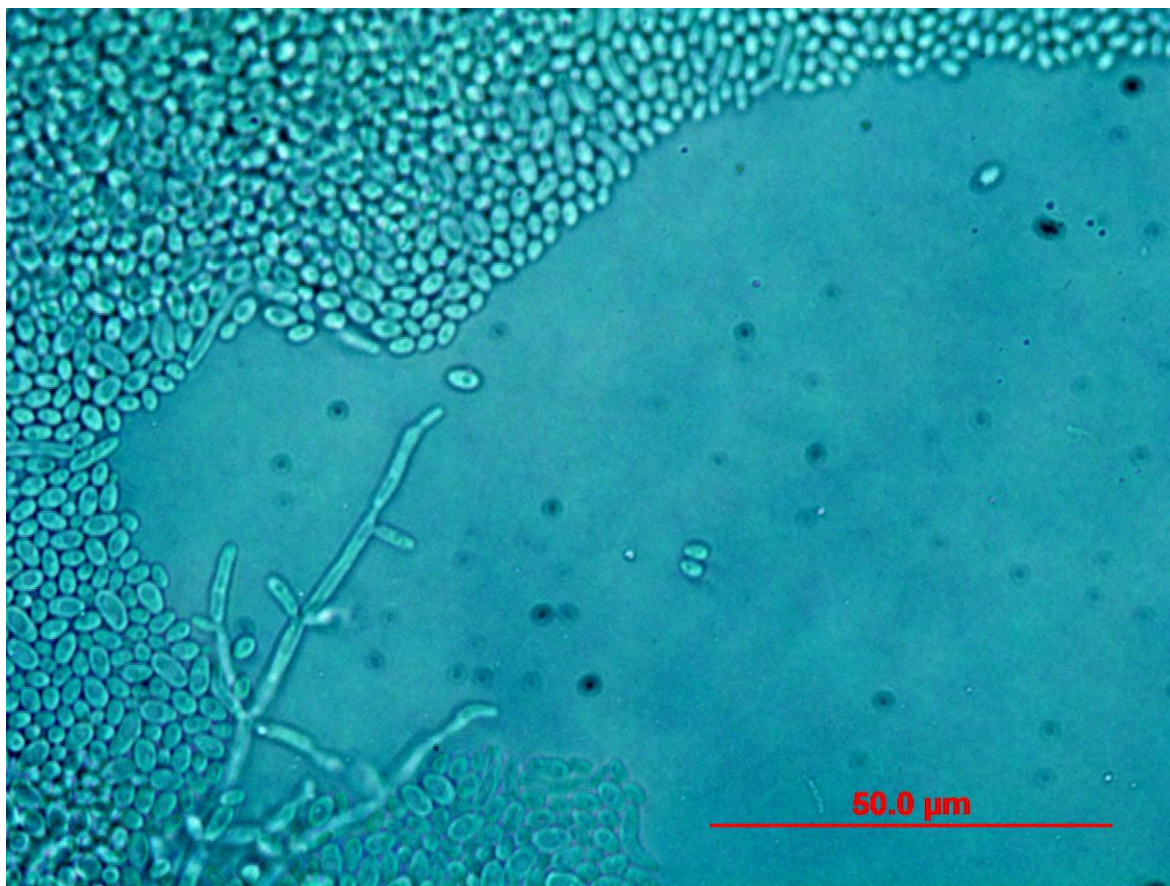


**b) Sabouraudův agar** (7 dní/25 °C)



**Obrázek 10.: *Candida parapsilosis*; mikro a makromorfologie**

**a) rýžový agar (po 20 h/24 °C)**



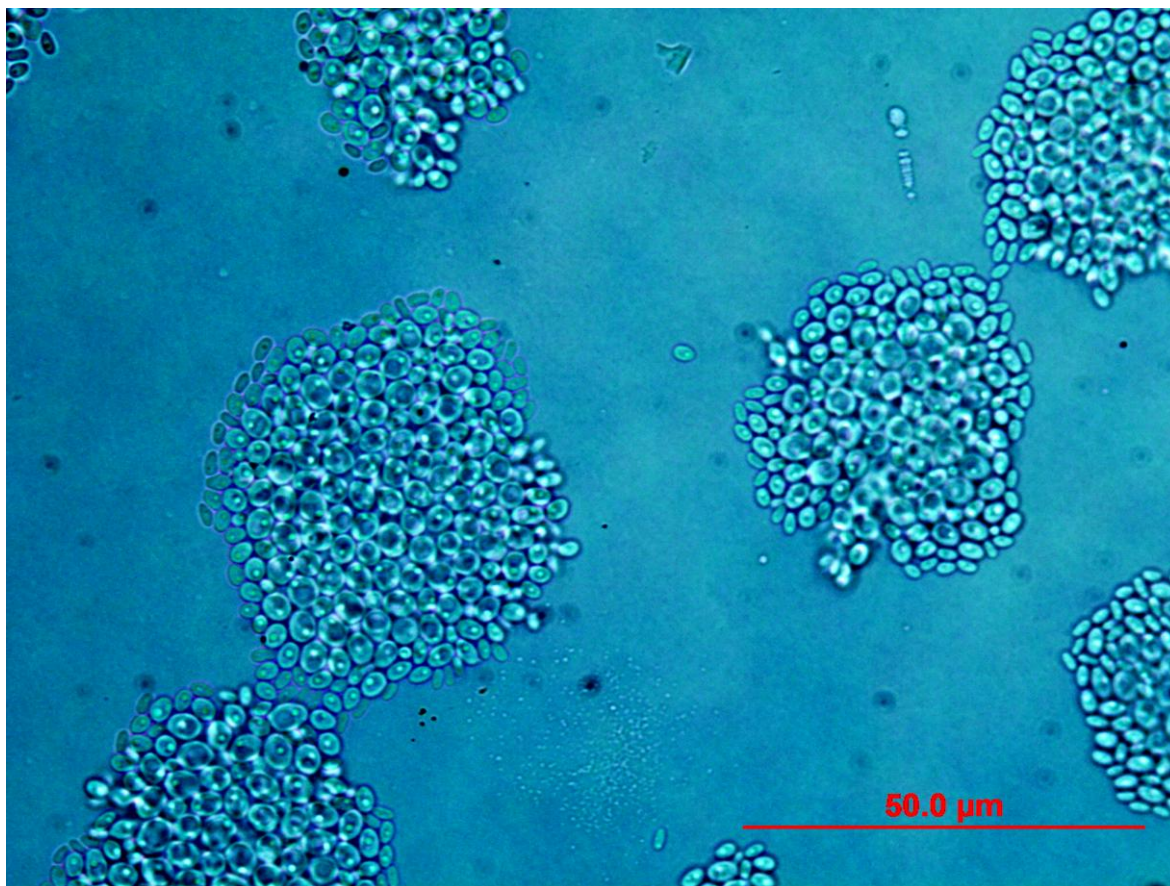
**b) Sabouraudův agar (7 dní/25 °C)**





***Obrázek 11.: Candida fabianii***; mikro a makromorfologie

**a) rýžový agar** (po 20 h/24 °C)

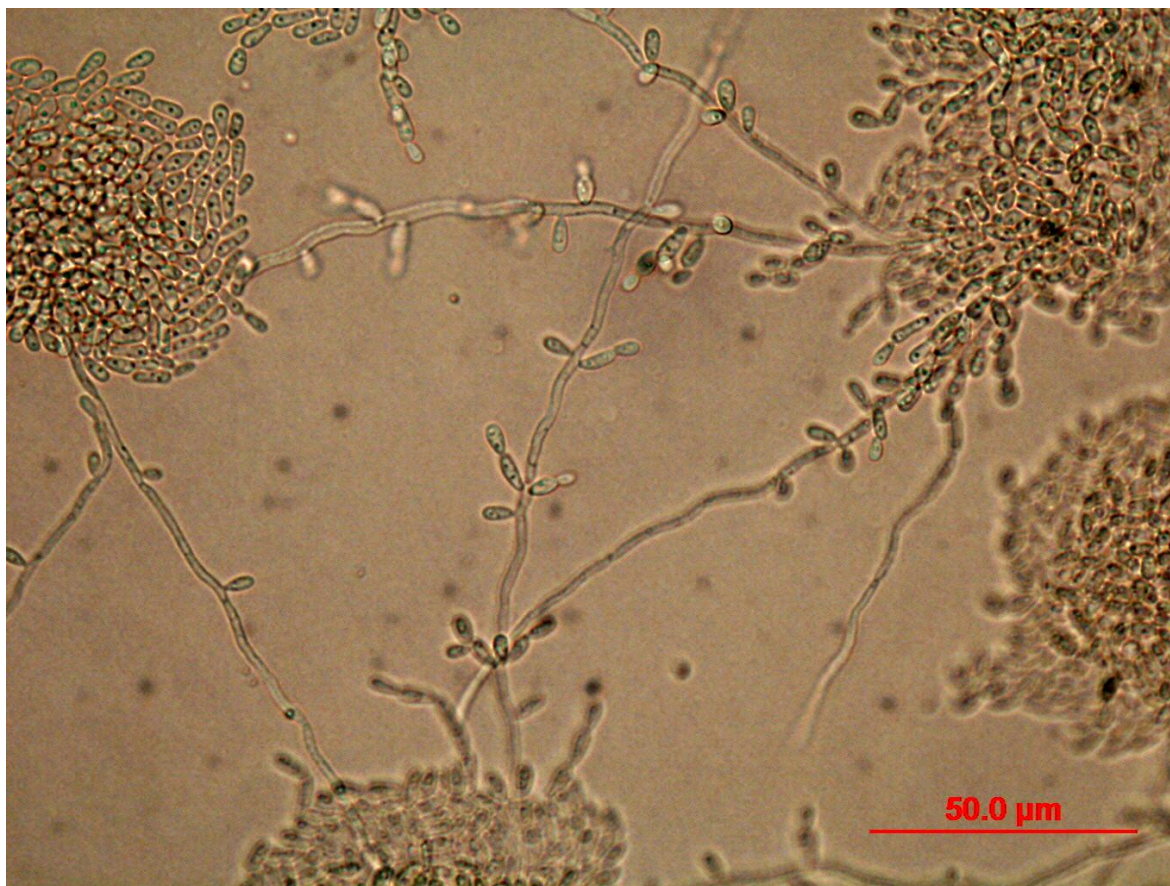


**b) Sabouraudův agar** (7 dní/25 °C)



**Obrázek 12.: *Candida tropicalis*; mikro a makromorfologie**

**a) rýžový agar (po 20 h/24 °C)**



**b) Colorex Candida (48 h/37 °C)**



**c) Sabouraudův agar (7 dní/25 °C)**





**Obrázek 13.** *C. albicans*; slizniční orální kandidóza "soor"



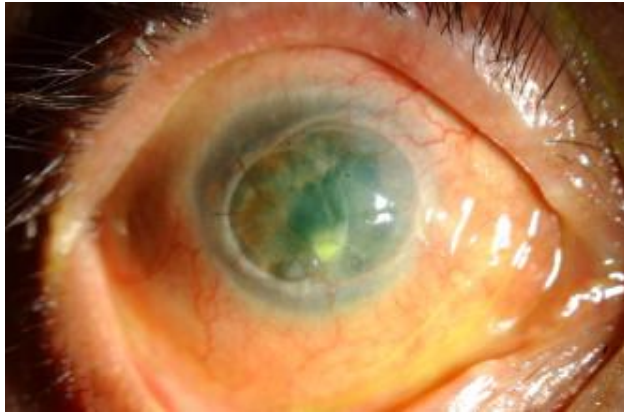
**Obrázek 14.** Lokální povrchové kandidózy

a) *C. parapsilosis*; interdigitální dermatomykóza      b) *C. parapsilosis*; onychomykóza

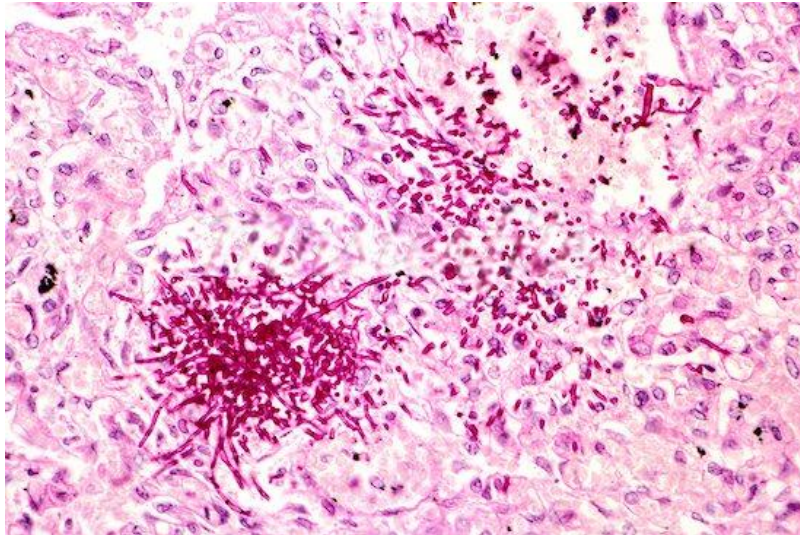




**Obrázek 15.:** *C. tropicalis*; endoftalmitida



**Obrázek 16.:** *C. albicans*; infekce plic (PAS barvení, zvětšeno 100x)



**Obrázek 17.:** *C. albicans*; kandidémie (barvení Giemsou, zvětšeno 100x)

