

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

BIOTYPIZÁCIA KVASINIEK SKUPINY CRYPTOCOCCUS LAURENTII
HMOTNOSTNOU SPEKTROMETRIOU

DIPLOMOVÁ PRÁCE

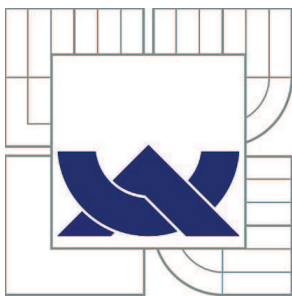
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

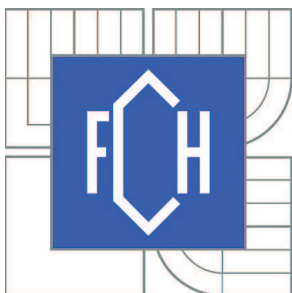
AUTHOR

Bc. JAKUB JÄGER

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

BIOTYPIZÁCIA KVASINIEK SKUPINY CRYPTOCOCCUS LAURENTII HMOTNOSTNOU SPEKTROMETRIOU

BIOTYPING OF CRYPTOCOCCUS LAURENTII GROUP USING MASS SPECTROMETRY

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

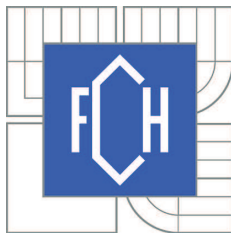
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. JAKUB JÄGER

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. EVA STRATILOVÁ, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0850/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jakub Jäger	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Eva Stratilová, Ph.D.	
Konzultanti:	RNDr. Pavel Řehulka, PhD.	

Název diplomové práce:

Biotypizácia kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* hmotnostnou spektrometriou

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuze

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jakub Jäger
Student(ka)

Ing. Eva Stratilová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Tato práce vznikla za podpory projektu BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt je realizován v rámci Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, který je spolufinancovaný z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR.



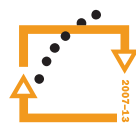
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

ABSTRAKT

Cryptococcus laurentii je vo všeobecnosti považovaný za saprofytický druh, avšak už bolo hlásených niekoľko prípadov ochorení ľudí i zvierat spôsobených práve týmito kvasinkami. Jedná sa o heterogénnu skupinu kapsulárnych mikroorganizmov s nejednoznačne vymedzenými taxonomickými hranicami. Na základe metód molekulárnej biológie bola skupina *Cryptococcus laurentii* rozdelená na dve fylogenetické skupiny, ktoré sa navzájom líšia. Je však pravdepodobné, že taxonómia tejto skupiny nie je definitívna a s pribúdajúcimi poznatkami sa bude meniť.

Kvôli nejednoznačnému taxonomickému statusu kvasiniek *Cryptococcus laurentii* a ich možnej patogenite sme sa rozhodli biotypizovať kmene skupiny *Cryptococcus laurentii* pomocou MALDI – TOF hmotnostnej spektrometrie, ktorá je považovaná za rýchlu, spoľahlivú a dokonca i relatívne lacnú metódu, schopnú identifikovať mikroorganizmy i na úrovni variety.

Na vybraných kmeňoch rodu *Cryptococcus* (*Cr. neoformans*, *Cr. laurentii*, *Cr. magnus*) zo Zbierky kultúr kvasiniek (CCY) bol optimalizovaný experimentálny postup MS analýzy pre tento rod. Zvolenou metódou bolo identifikovaných tridsaťtri kmeňov, pôvodne zaradených ako *Cryptococcus laurentii*. Na základe nameraných hmotnostných spektier boli tieto kmene prerozdelené do šiestich odlišných skupín. Z každej zo skupín bol vybraný aspoň jeden kmeň, u ktorého bola uskutočnená sekvenčná analýza D1/D2 domén LSU rRNA génu. Pomocou molekulárno biologickej analýzy bol zvolený kmeň identifikovaný a stal sa reprezentujúcim kmeňom danej skupiny.

Skupinu I tvorí typový *Cryptococcus laurentii* CCY 17-3-2, ktorý vykazoval odlišné spektrum ribozomálnych proteínov ako ostatné biotypizované kmene. Dokonca i s kmeňmi identifikovanými ako *Cryptococcus laurentii* bola podobnosť spektier nízka, čo by mohlo byť zapríčinené odlišnou varietou. Skupinu II reprezentuje *Cryptococcus laurentii* CCY 17-3-17. Okrem neho bolo do skupiny II priradených ďalších 13 kmeňov. Skupinu III reprezentuje *Cryptococcus flavesens* CCY 17-3-29. Do tejto skupiny bolo zaradených ďalších 12 kmeňov s takmer identickým hmotnostným spektrom. Do skupiny IV bol zaradený len jeden kmeň (CCY 17-3-13), ktorý bol pomocou sekvenácie genómu identifikovaný ako *Cryptococcus carnesens*. Rovnako jedného zástupcu (CCY 17-3-5) má i skupina V. Kmeň CCY 17-3-5 bol identifikovaný ako *Cryptococcus flavus*. Posledná skupina VI má troch členov a reprezentuje ju kmeň 17-3-35 identifikovaný ako *Bulleromyces albus*. Kým *Cr. laurentii* a *Cr. flavesens* patria do I. fylogenetickej skupiny a *Cr. carnesens* do II. fylogenetickej skupiny „skupiny *Cr. laurentii*“, identifikácia *Cr. flavus* a *Bulleromyces albus* viedla k vylúčeniu uvedených kmeňov z tejto „skupiny.“

Kľúčové slová: biotypizácia, MALDI – TOF MS, skupina *Cryptococcus laurentii*

ABSTRACT

Cryptococcus laurentii has been classically considered a saprophytic species, although several cases of human and animal infection have been already reported. This species is reported to be heterogenous. The taxonomy of yeast *Cryptococcus laurentii* was always highly ambiguous. The application of molecular biology and bioinformatic methods led to dividing of searched strains to two distinct phylogenetic groups, some varieties were recognized as species and the locution „*Cryptococcus laurentii* group“ was introduced. The taxonomy of this group is likely not definitive and with advancing knowledge will change.

Our aim was the identification of individual species within this group based on matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry (MALDI – TOF MS), which has recently been described as a rapid, reliable, cost-effective and powerful tool for analyzing of microorganisms, even on variety level. Generally, the yeasts of genus *Cryptococcus* form highly resistant polysaccharide capsules and produce large amount of extracellular polysaccharides, therefore belong to so called „difficult“ cases for biotyping.

The experimental protocol has been optimized for MS analysis of this genus on the selected strains of *Cr. neoformans*, *Cr. laurentii* and *Cr. magnus* from the Culture Collection of Yeasts (CCY). Thirty-three strains, originally classified as *Cryptococcus laurentii* has been identified by chosen method. These strains were distributed into six different groups according their spectra similarities. It was selected at least one strain of each group, which was classified based on the sequence analysis of the D1/D2 domains of the LSU rRNA gene. This strain (with known sequence) became representative for its group.

Type strain of *Cryptococcus laurentii* (CCY 17-3-2) belongs to the group I. Its MS spectrum of ribosomal proteins differ from mass spectra of all other biotyped species, even with strains identified as *Cryptococcus laurentii* was the similarity of the spectra low, which could be caused by identification of two different varieties. The group II is represented by *Cryptococcus laurentii* CCY 17-3-17. Except this strain, thirteen more strains belong to the group II. The group III represents *Cryptococcus flaveszens* CCY 17-3-29. This group included 12 additional strains with almost identical mass spectra. Group IV included only one strain (CCY 17-3-13), which was identified as *Cryptococcus carnescens* based on gene sequence analysis. Similarly, one representative (CCY 17-3-5) has the group V. Strain CCY 17-3-5 was identified as *Cryptococcus flavus*. The last group VI of three members represents strain 17-3-35 identified as *Bulleromyces albus*. While *Cr. laurentii* and *Cr. flaveszens* belong to phylogenetic group I and *Cr. carnescens* to the phylogenetic group II, four strains giving two types of different MS spectra and identified as *Cr. flavus* (1 strain) and *Bulleromyces albus* (3 strains) were excluded from „*Cr. laurentii* group.“

Key words: biotyping, MALDI – TOF MS, *Cryptococcus laurentii* group

JÄGER, J. *Biotypizácia kvasiniek skupiny Cryptococcus laurentii hmotnostnou spektrometriou*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 70 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Stratilová, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval sám za pomoci odbornej literatúry a vedúcej práce, pani Ing. Evy Stratilovej, Ph.D., a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brně a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis

POĎAKOVANIE

Ďakujem vedúcej diplomovej práce Ing. Eve Stratilovej, Ph.D. a zároveň Barbore Stratilovej, Ing. Pavlovi Řehulkovi, Ph.D. a celému kolektívu zo Slovenskej Akadémie vied za ich pomoc, ochotu a najmä profesionálne vedenie, rady a podporu pri riešení mojej diplomovej práce.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČASŤ	7
2.1	Rod <i>Cryptococcus</i>	7
2.1.1	Všeobecná charakteristika rodu <i>Cryptococcus</i>	7
2.1.2	Typové kmene rodu <i>Cryptococcus</i>	9
2.1.3	Zástupcovia rodu <i>Cryptococcus</i>	9
2.1.4	Virulencia a patogenita rodu <i>Cryptococcus</i>	12
2.2	<i>Cryptococcus laurentii</i> (Kufferath) C.E. Skinner (1950).....	14
2.3	Ďalšie významné druhy <i>Cryptococcus laurentii</i> skupiny	19
2.3.1	<i>Cryptococcus aureus</i> (Saito) Takashima, Sugita, Shinoda a Nakase (2003)	19
2.3.2	<i>Cryptococcus flavescens</i> (Saito) C.E. Skinner (1950).....	20
2.3.3	<i>Cryptococcus carnescens</i> (Verona a Luchetti) Takashima et al. (2003).....	21
2.3.4	<i>Cryptococcus penaeus</i> (Phaff, Mrak a Williams) Takashima et al. (2003)	22
2.3.5	<i>Cryptococcus victoriae</i> M.J. Montes, et al. (1999)	22
2.4	Identifikácia mikroorganizmov pomocou hmotnostnej spektrometrie	23
2.4.1	Identifikácia kvasiniek pomocou hmotnostnej spektrometrie	25
2.5	MALDI Biotyper Realtime Klasifikácia (RTC)	26
2.5.1	Generácia „molekulárneho odtlačku prstu“	27
2.5.2	Výpočet hodnoty skóre.....	27
2.6	Hmotnostná spektrometria (MS).....	27
2.6.1	Ionizácia v MS.....	28
2.6.2	Analyzátory v MS	29
2.6.3	Detektory v MS	30
3	CIEĽ PRÁCE	32
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	33
4.1	Zoznam použitých kvasiniek.....	33
4.2	Kultivačné médium	34
4.2.1	Tekuté laktózové médium	34
4.2.2	Sladinový agar	35
4.3	Dĺžka kultivácie	35
4.4	Odber vzoriek.....	35
4.5	Premývanie buniek.....	35
4.6	Extrakcia proteínov	35
4.7	Použité MALDI matrice.....	36
4.7.1	Kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová (CHCA)	36
4.7.2	Zmesná MALDI matrica	36
4.8	Nanášanie vzorky na MALDI platňu	37
4.9	Hmotnostná spektrometria	37
4.9.1	Softvér na vyhodnocovanie hmotnostných spektier.....	37
4.10	Sekvenčná analýza D1/D2 domén LSU rRNA génu	37
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	38
5.1	Optimalizácia metódy prípravy vzorky na analýzu hmotnostnou spektrometriou	38
5.1.1	Vplyv kultivačného média.....	38
5.1.2	Voľba doby kultivácie	39

5.1.3	Vplyv premývania buniek na získané hmotnostné spektrá	39
5.1.4	Vplyv doby extrakcie, koncentrácie extrakčného činidla a rozpúšťadiel.....	40
5.1.5	Rozdiely vplyvu použitých MALDI matríc	41
5.1.6	Nanášanie vzoriek na MALDI platňu	41
5.1.7	Návrh optimalizovanej metódy pre biotypizáciu kvasiniek rodu <i>Cryptococcus</i> ...	41
5.2	Biotypizácia kvasiniek skupiny <i>Cryptococcus laurentii</i>	44
5.2.1	Skupina I.....	45
5.2.2	Skupina II	45
5.2.3	Skupina III:	46
5.2.4	Skupina IV.....	47
5.2.5	Skupina V	48
5.2.6	Skupina VI.....	48
5.2.7	Zastúpenie druhov v rámci pôvodnej skupiny <i>Cryptococcus laurentii</i>	49
6	ZÁVER	51
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	53
8	PRÍLOHY	64
8.1	Príprava vzoriek podľa Bruker protokolu pre obtiažné prípady [97].....	64
8.2	Porovnanie hmotnostných spektier biotypizovaných kvasiniek	64
8.2.1	<i>Cryptococcus laurentii</i> (skupina II)	64
8.2.2	<i>Cryptococcus flavescens</i> (skupina III)	67

1 ÚVOD

Taxonómia kvasiniek *Cryptococcus laurentii* bola a stále i je veľmi nejednoznačná. Tak ako sa vyvíjali metódy na identifikáciu mikroorganizmov, menilo sa aj taxonomické zaradenie týchto kvasiniek. V súčasnosti sa vo všeobecnosti mikroorganizmy identifikujú a taxonomicky zaraďujú najmä na základe sekvenácie genómu. A práve poznatky a aplikácie molekulárnej biológie a bioinformačných metód viedli k prerozdeleniu známych kmeňov kvasiniek *Cryptococcus laurentii*. Niektoré variety boli uznané ako samostatný druh a zaviedol sa pojem skupina *Cryptococcus laurentii*.

Táto pomerne početná skupina kvasiniek je fylogeneticky rozdelená na dve odlišné skupiny. V súčasnej dobe prvá fylogenetická skupina obsahuje druhy *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus flaveszens* a *Cryptococcus aureus*. Základom druhej skupiny sú *Cryptococcus carnescens*, *Cryptococcus peneaus*, *Cryptococcus dimennae*, *Cryptococcus victoriae* a *Bullera globispora*.

Cieľom tejto práce bola identifikácie jednotlivých druhov kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* (CCY) pomocou MALDI – TOF hmotnostnej spektrometrie, ktorá sa v posledných rokoch začína čoraz častejšie využívať na rutinnú identifikáciu mikroorganizmov, tzv. biotypizáciu. Jej popularita súvisí s dobrými detekčnými limitmi, nízkou cenou analýzy a hlavne rýchlosťou identifikácie. Postupne tak dopĺňa a nahrádza časovo náročné metódy molekulárnej biológie, ktoré si stále udržujú popredné postavenie.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Rod *Cryptococcus*

2.1.1 Všeobecná charakteristika rodu *Cryptococcus*

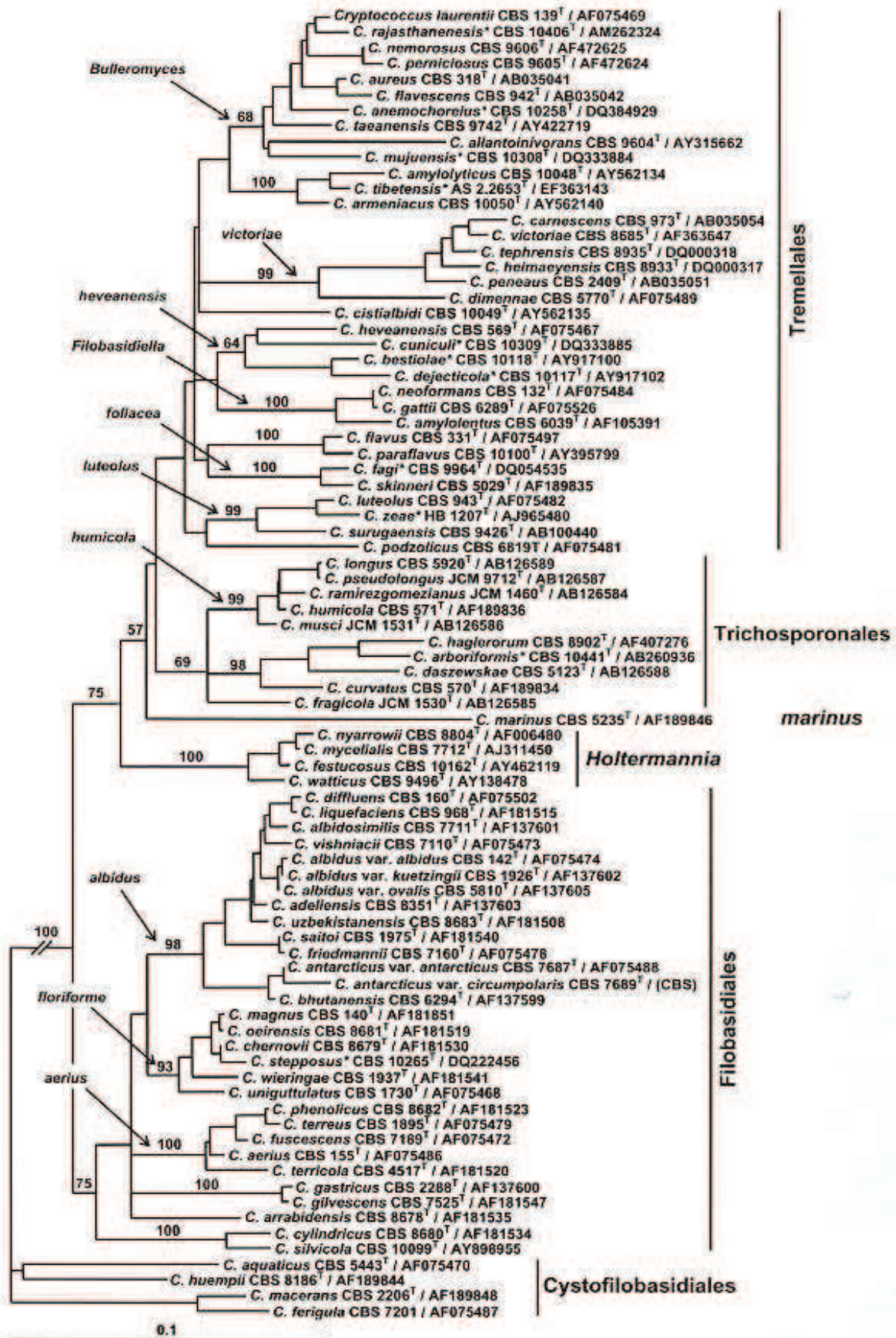
Zástupcovia rodu *Cryptococcus* sú bazídiomycétové mikroorganizmy s celosvetovým rozšírením. Tieto kvasinky bývajú často izolované z pôdy, vzduchu, rastlín a rezervoárom niektorých druhov je prostredie bohaté na dusíkaté láty, napr. vtáčí trus [1], [2], [3].

Nepohlavné rozmnožovanie: Bunky sú guľovitého alebo ovoidného tvaru, môžu byť aj pretiahnuté alebo polymorfné [4], [1], [5]. Väčšina kmeňov tvorí polysacharidové kapsule, ktoré chránia bunky pred nepriaznivými podmienkami prostredia vrátane imunitnej odpovede napadnutého organizmu. Tvorba kapsúl súvisí s patogenitou niektorých členov rodu *Cryptococcus* (*Cr. neoformans*) a závisí od zloženia kultivačného média. Za špecifických rastových podmienok môže kapsula obsahovať látky podobné škrobu, ktoré vylučuje do média [4], [6]. Rozmnožujú sa multilaterálnym alebo polárnym enteroblastickým pučaním. Menej často tvoria pseudomycélium, častejšie rastú vo forme pravého mycélia. Neprodukujú askospóry, balistospóry ani balistokonídie. Na pevnom médiu veľa kmeňov tvorí slizovité kolónie bielej prípadne krémovej farby. Niektoré kmene môžu tvoriť červené, žlté alebo hnedé pigmenty [1], [5].

Pohlavné rozmnožovanie: Pre väčšinu kmeňov nebolo determinované sexuálne rozmnožovanie, avšak niektoré kmene sú anamorfné štádiá telemorfných rodov *Filobasidium*, *Filobasidiella*, *Cystofilobasidium* a ďalších [1], [5]. U najznámejšieho predstaviteľa rodu, *Cryptococcus neoformans*, sa telemorfné štádium označuje ako *Filobasidiella neoformans* [1], [5], [7] a vzniká po splynutí dvoch kvasinkových buniek opačných párovacích typov. Po fúzii buniek sa formuje dvojjadrová hýfa, na ktorej vyrastá štíhle bazídium a na ňom sa následne objavujú retiazky bazidiospór. Septá medzi jednotlivými bunkami mycélia sú bazídiomycétového typu [8], [9], [10], [11].

Fyziológia/biochémia: Všetky kmene využívajú D-glukuronát a takmer všetky syntetizujú extracelulárne polysacharidy. Tie kmene, ktoré neprodukujú škrob, metabolizujú inozitol a D-glukuronát, čím sa odlišujú od druhov radených do rodu *Rhodotorula*. Zvyčajne chýba schopnosť fermentácie cukrov. Reakcie s diazóniovou modrou B (DBB) a test na ureázovú aktivitu majú pozitívny. Z monosacharidov prítomných v bunkových stenách je dominantná glukóza, ďalej manóza a xylóza. Hlavnými ubichinónmi sú CoQ-8, 9 a 10 [4], [1], [5]. Majú minimálne rastové požiadavky, pretože ako zdroje uhlíka a dusíka vyžadujú iba jednoduché organické zlúčeniny a kultivačné médium nemusí byť obohatené o vitamíny [12].

Fylogenetické umiestnenie: Molekulárne a fylogenetické štúdie (napr. [13], [14], [15]) preukázali, že rod *Cryptococcus* je polyfyletický. Hranice rodu nie sú ostro definované, vymedzené sú najmä na základe fyziologických vlastností jeho zástupcov. Na základe obsahu G + C párov v genóme a sekvenovania génu 26S rRNA bola v rode *Cryptococcus* preukázaná vnútorodová i vnútrodrohová variabilita [16], [14]. Druhy tohto rodu sa nachádzajú vo všetkých piatich hlavných radoch (Tremellales, Trichosporonales, Holtermannia, Filobasidiales a Cystofilobasidiales) podtriedy Tremellomycetidae (**Obr. 1**). Niekedy sa prelínajú s druhmi iných anamorfných (napr. *Bullera*) alebo telemorfných (napr. *Tremella*) rodov [5].



Obr.1: Fylogenetický vzťah druhov v rámci rodu *Cryptococcus* [5].

Hoci sa taxonomický status rodu *Cryptococcus* a fylogenetické vzťahy medzi jeho jednotlivými druhmi vďaka molekulárne biologickým metódam stále spresňujú, možno do budúcnosti s určitosťou očakávať ďalšie revízie jeho klasifikácie.

2.1.2 Typové kmene rodu *Cryptococcus*

- a) *Cryptococcus mobilis* Kützig 1833 [4]
- b) *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin 1901 [1], [5]

U *Cryptococcus neoformans* bol, ako v prípade ďalších významných mikroorganizmov, zahájený projekt sekvenovania genómu [17]. Táto kvasinka sa stala jedným z prvých bazídiomycetových organizmov, u ktorého bol projekt dokončený [18], [19].

2.1.3 Zástupcovia rodu *Cryptococcus*

2.1.3.1 Akceptované kmene rodu *Cryptococcus* (rok 1984)

V roku 1984 boli podľa literatúry [4] akceptované tieto kmene:

1. *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner (Saito, 1922)
 - a. *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner var. *albidus*
 - b. *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner var. *aerius* (Saito) Phaff et Fell (1922)
2. *Cryptococcus ater* Castellani ex Cooke (1966)
3. *Cryptococcus dimennae* Fell et Phaff (1967)
4. *Cryptococcus elinovii* Goluber et Tauson (1979)
5. *Cryptococcus flavus* (Saito) Phaff et Fell (Saito, 1922)
6. *Cryptococcus gastricus* Reiersöl et di Menna (1958)
7. *Cryptococcus heveanensis* (Groenewege) Baptist et Kurtzman (1921)
8. *Cryptococcus hungaricus* (Zsolt) Phaff et Fell (1957)
9. *Cryptococcus infirmo-miniatius* (Okunuki) Phaff et Fell (1931)
10. *Cryptococcus kuetzingii* Fell et Phaff (1967)
11. *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner (1920)
12. *Cryptococcus luteolus* (Saito) Skinner (1922)
13. *Cryptococcus macerans* (Frederiksen) Phaff et Fell (1956)
14. *Cryptococcus magnus* (Lodder et Krager-van Rij) Baptist et Kurtzman (1952)
15. *Cryptococcus melibiosum* (Shifrine et Phaff) Phaff et Fell (1956)
16. *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (1895)
 - a. *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin var. *neoformans*
 - b. *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin var. *gatti* Vanbreuseghem et Takashio (1970)
17. *Cryptococcus skinneri* Phaff et do Carmo-Sousa (1962)
18. *Cryptococcus terreus* di Menna (1954)
19. *Cryptococcus uniguttulatus* (Zach) Phaff et Fell (Wolfram et Zach, 1934)

2.1.3.2 Akceptované kmene rodu *Cryptococcus* (rok 2000)

Preradenie bazídiomycetových druhov, u ktorých bola v bunkových hydrolyzátoch detekovaná xylóza, z rodu *Candida* do rodu *Cryptococcus*, rozšírilo počet jeho členov z devätnásť na tridsaťštyri.

V roku 2000 boli podľa literatúry [1] akceptované tieto kmene:

1. *Cryptococcus aerius** (Saito) Nannizzi (1927)
2. *Cryptococcus albidosimilis** Vishniac et Kurtzman (1992)

3. *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner (1947)
4. *Cryptococcus amylolentus** Golubev (1981)
5. *Cryptococcus antarcticus** Vishniac et Kurtzman (1992)
6. *Cryptococcus aquaticus** Jones et Slooff (1988)
7. *Cryptococcus ater* (Castellani ex Cooke) Phaff et Fell (Lodder 1970)
8. *Cryptococcus bhutanensis** S. Goto et Sugiyama (1970)
9. *Cryptococcus consortionis** Vishniac (1985)
10. *Cryptococcus curvatus** Golubev (1981)
11. *Cryptococcus dimennae** Fell et Phaff (1967)
12. *Cryptococcus feraegula** Saëz et. Rodrigues de Miranda (1988)
13. *Cryptococcus flavus* (Saito) Phaff et Fell (1970)
14. *Cryptococcus friedmannii** Vishniac (1985)
15. *Cryptococcus fuscescens** Golubev (1984)
16. *Cryptococcus gastricus* Reiersöl et di Menna (1985)
17. *Cryptococcus gilvescens** Chernov (1988)
18. *Cryptococcus heveanensis* (Groenewege) Baptist et Kurtzman (1976)
19. *Cryptococcus huempii** Roeijmans (1989)
20. *Cryptococcus humicolus** Golubev (1981)
21. *Cryptococcus hungaricus* (Zsolt) Phaff et Fell (1970)
22. *Cryptococcus kuetzingii* Phaff et Fell (1967)
23. *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C.E. Skinner (1950)
24. *Cryptococcus luteolus* (Saito) C.E. Skinner (1950)
25. *Cryptococcus macerans* (Frederiksen) Phaff et. Fell (1970)
26. *Cryptococcus magnus* Baptist et Kurtzman (1976)
27. *Cryptococcus marinus** Golubev (1981)
28. *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (1901)
29. *Cryptococcus podzolicus** Golubev (1981)
30. *Cryptococcus skinneri* Phaff et do Carmo-Sousa (1962)
31. *Cryptococcus terreus* di Menna (1954)
32. *Cryptococcus uniguttulatus* (Zach) Phaff et Fell (1970)
33. *Cryptococcus vishniacii** Vishniac et Hempfling (1979)
34. *Cryptococcus yarrowii** A. Fonseca et van Uden (1991)

Kmene označené hviezdíčkou (*) v roku 1984 ešte neboli akceptované za členov rodu *Cryptococcus*. Naopak oproti roku 1984 boli zo zoznamu akceptovaných kmeňov vyradené tieto kmene:

1. *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner var. *albidus*
2. *Cryptococcus elinovii* Goluber et Tauson (1979)
3. *Cryptococcus infirmo-miniatu*s (Okunuki) Phaff et Fell (1931)
4. *Cryptococcus melibiosum* (Shifrine et Phaff) Phaff et Fell (1956)
5. *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner var. *aerius* (Saito) Phaff et Fell (1922) bol prerađený z variety na samostatný kmeň *Cryptococcus aerius*

2.1.3.3 Akceptované kmene rodu *Cryptococcus* (rok 2011)

V roku 2011 boli podľa literatúry [5] akceptované tieto kmene:

1. *Cryptococcus adeliensis** Scorzetti, Petrescu, Yarrow, Fell (2000)
2. *Cryptococcus aerius* (Saito) Nannizzi (1927)

3. *Cryptococcus albidosimilis* Vishniac et Kurtzman (1992)
4. *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner (1950)
 - a. *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *albidus** (1967)
 - b. *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *kuetzingii** Fonseca (2000)
 - c. *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *ovalis* Sugiyama, Goto (1967)
5. *Cryptococcus allantoinivorans** Middelhoven (2005)
6. *Cryptococcus amylolentus* Golubev (1981)
7. *Cryptococcus amylolyticus** Fonseca, Inácio et Spencer-Martins (2005)
8. *Cryptococcus antarcticus* Vishniac et Kurtzman (1992)
 - a. *Cryptococcus antarcticus* Vishniac et Kurtzman var. *antracticus** (2002)
 - b. *Cryptococcus antarcticus* Vishniac et Kurtzman var. *circumpolaris** (2002)
9. *Cryptococcus aquaticus* Jones et Slooff (1988)
10. *Cryptococcus armeniacus** Fonseca, Inácio (2005)
11. *Cryptococcus arrabidensis** Fonseca, Scorzetii, Fell (2000)
12. *Cryptococcus aureus** (Saito) Takashima, Sugita, Shinoda et Nakase (2003)
13. *Cryptococcus bhutanensis* Goto et Sugiyama (1970)
14. *Cryptococcus carnescens** Takashima, Sugita, Shinoda et Nakase (2003)
15. *Cryptococcus chernovii** Fonseca, Scorzetii, Fell (2000)
16. *Cryptococcus cistialbidi** Fonseca, Inácio et Spencer-Martins (2005)
17. *Cryptococcus curvatus* Golubev (1981)
18. *Cryptococcus cylindricus** Fonseca, Scorzetii, Fell (2000)
19. *Cryptococcus daszewskae** Takashima, Sugita, Shinoda et Nakase (2003)
20. *Cryptococcus diffluens** (Zach) Lodder et Kreger-vanRij (1952)
21. *Cryptococcus dimennae* Fell et Phaff (1967)
22. *Cryptococcus ferigula* Saëz et. Rodrigues de Miranda (1988)
23. *Cryptococcus festucosus** W. Golubev et Sampaio (2004)
24. *Cryptococcus flavescens** (Saito) C.E. Skinner (1950)
25. *Cryptococcus flavus* (Saito) Phaff et Fell (1970)
26. *Cryptococcus fragicola** Takashima, Sugita, Shinoda et Nakase (2001)
27. *Cryptococcus friedmannii* Vishniac (1985)
28. *Cryptococcus fuscescens* Golubev (1984)
29. *Cryptococcus gastricus* Reiersöl et di Menna (1985)
30. *Cryptococcus gatti** Kwon-Chung et Boekhout (2002)
31. *Cryptococcus gilvescens* Chernov (1988)
32. *Cryptococcus haglerorum** Middelhoven, Fonseca et al (2003)
33. *Cryptococcus heimaeyensis** Vishniac (2002)
34. *Cryptococcus heveanensis* (Groenewege) Baptist et Kurtzman (1976)
35. *Cryptococcus huempfi* Roeljmans (1989)
36. *Cryptococcus humicola* Golubev (1981)
37. *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C.E. Skinner (1950)
38. *Cryptococcus liquefaciens** Fonseca, Boekhout, Fell (2009)
39. *Cryptococcus longus** Takashima, Sugita, Shinoda et Nakase (2001)
40. *Cryptococcus luteolus* (Saito) C.E. Skinner (1950)
41. *Cryptococcus macerans* (Frederiksen) Phaff et. Fell (1970)
42. *Cryptococcus magnus* Baptist et Kurtzman (1976)
43. *Cryptococcus marinus* Golubev (1981)

44. *Cryptococcus musci** Takashima, Sugita, Shinoda et Nakase (2001)
45. *Cryptococcus mycelialis** Golubev (2003)
46. *Cryptococcus nemorosus** Golubev et al (2003)
47. *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (1901)
48. *Cryptococcus nyarrowii** Thomas-Hall, Watson (2002)
49. *Cryptococcus oeirensis** Fonseca, Scorzetti, Fell (2000)
50. *Cryptococcus paraflavus** Golubev, Sampaio (2004)
51. *Cryptococcus peneaus** Takashima, Sugita, Shinoda et Nakase (2003)
52. *Cryptococcus perniciosus** Golubev et al (2003)
53. *Cryptococcus phenolicus** Fonseca, Scorzetti, Fell (2000)
54. *Cryptococcus podzolicus* Golubev (1981)
55. *Cryptococcus pseudolongus** Takashima, Sugita, Shinoda et Nakase (2001)
56. *Cryptococcus ramirezgomezianus** Takashima, Sugita, Shinoda et Nakase (2001)
57. *Cryptococcus saitoi** Fonseca, Scorzetti, Fell (2000)
58. *Cryptococcus silvicola** Golubev et Sampaio (2006)
59. *Cryptococcus skinneri* Phaff et do Carmo-Sousa (1962)
60. *Cryptococcus surugaensis** Nagahama, Hamamoto et Nakase (2003)
61. *Cryptococcus taeanensis** Skin et Park (2005)
62. *Cryptococcus tephrensis** Vishniac (2002)
63. *Cryptococcus terreus* di Menna (1954)
64. *Cryptococcus terricola** Pedersen (1958)
65. *Cryptococcus uniguttulatus* (Zach) Phaff et Fell (1970)
66. *Cryptococcus uzbekistanensis** Fonseca, Scorzetti, Fell (2000)
67. *Cryptococcus victoriae** M.J. Montes, et al (1999)
68. *Cryptococcus vishniacii* Vishniac et Hempfling (1979)
69. *Cryptococcus watticus** Guffog et al (2004)
70. *Cryptococcus wieringae** Fonseca, Scorzetti, Fell (2000)

Kmene označené hviezdíčkou (*) v roku 2000 neboli zaradené medzi akceptovaných zástupcov rodu *Cryptococcus*. Naopak oproti roku 2000 bolo zo zoznamu akceptovaných kmeňov vyradených týchto päť kmeňov:

1. *Cryptococcus ater* (Castellani ex Cooke) Phaff et Fell (Lodder 1970)
2. *Cryptococcus consortionis* Vishniac (1985)
3. *Cryptococcus hungaricus* (Zsolt) Phaff et Fell (1970)
4. *Cryptococcus kuetzingii* Phaff et Fell (1967)
5. *Cryptococcus yarrowii** A. Fonseca et van Uden (1991)

2.1.4 Virulencia a patogenita rodu *Cryptococcus*

Za najvýznamnejší virulentný faktor kvasiniek rodu *Cryptococcus* je považovaná polysacharidová kapsula [20]. Kapsula *Cryptococcus neoformans* je zložené z polysacharidov obsahujúcich vo svojej molekule manózu. Najväčšiu časť kapsule (až 90 % hmotnosti) predstavuje acidický heteropolysacharid, glukuronoxylomanán, ktorého hlavný lineárny reťazec je tvorený D-manózovými jednotkami spojenými α -1,3 glykozidickou väzbou. Manózové jednotky sú bohato substituované molekulami xylózy a glukurónovej kyseliny. V menšej miere je v kapsule zastúpený galaktoxylomanán, u ktorého je glukurónová kyselina nahradená galaktózou. Tretia zložka obsahujúca sacharid je manoproteín. Na pevných

médiách sa prítomnosť kapsule u daného kmeňa odráža v slizovitom vzhľade kolónií [4], [21], [22], [23].

Strata schopnosti syntetizovať kapsulu vedie u mutantných kmeňov k významnému zníženiu virulencie. Dôvodom je lepšia schopnosť makrofágov, monocytov a neutrofilov fagocytovať nezapuzdrené bunky. Bunky pokryté kapsulou majú touto štruktúrou tienené svoje „kryptokokové“ antigény, ktoré vďaka tomu nemôžu byť rozpoznané T-lymfocytmi. Z toho dôvodu je i imunitná odpoveď hostiteľa na zapuzdrené bunky slabá [20], [22], [24]. Hoci je kapsula významný virulentný faktor, je jeho primárnou funkciou pravdepodobne ochrana bunky pred nepriaznivými vplyvmi prostredia suchom, nedostatkom dusíka a pred predátormi (amébami) [25].

Za ďalšie virulentné faktory kvasiniek rodu *Cryptococcus*, sú považované enzýmy proteáza, fosfolipáza a ureáza ako aj tvorba melanínu a manitolu [26]. Melanín je amorfná zlúčenina, ktorá tvorí približne 15 % suchej váhy kvasinkovej bunky, dodáva bunkovej stene výstuž a robí z nej veľmi rigidnú štruktúru [27], [28]. Tento pigment umožňuje kvasinkám lepšie čeliť stresovým faktorom. Prispieva k odolnosti mikroorganizmov voči oxidačným činidlám a vnútrobunkovým aniónom makrofágov [26]. Kmene vytvárajúce melanín sú odolnejšie k ultrafialovému žiareniu a sú menej citlivé na amfotericín B (používa sa na liečbu mykóz). Melanín má tiež schopnosť sa viazať na niektoré mikrobicídne proteíny leukocytov, vďaka čomu chráni bunky patogénu pred ich účinkami [27], [29], [30]. Napríklad typový zástupca rodu a zároveň pre človeka patogénna kvasinka, *Cryptococcus neoformans*, vytvára melanín z pyrokatecholov, aminofenolov alebo difenolov a na rozdiel od cicavcov ho nesyntetizuje z tyrozínu. *Cryptococcus neoformans* nie je jediný zástupca rodu *Cryptococcus* produkujúci melanín. Okrem „kryptokokov“ ho syntetizujú aj ďalšie významné ľudské patogény ako napr. *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* alebo *Wangiella dermatitidis* [26], [27].

Čo sa týka virulentného účinku manitolu, mutantné kmene patogénnych druhov produkujúce manitol v zníženej miere sú menej virulentné. Navyše sú citlivejšie voči tepelnému šoku a vysokej koncentrácii solí. Potenciálnym mechanizmom účinku manitolu je jeho hromadenie v mozgu, ktoré vedie k vzniku opuchov. Manitol má navyše schopnosť vychytávať hydroxylové radikály a zrejme tak chráni bunky mikroorganizmu pred ich nepriaznivými účinkami a pôsobí antioxidantne [30], [31].

Enzýmy produkované *Cryptococcus neoformans* sa na jeho patogenitu pravdepodobne podieľajú narušením bunkových štruktúr hostiteľa, čím umožňujú penetráciu kvasinky hlbšie do tkanív. Pomocou proteolytických enzýmov je *Cryptococcus neoformans* schopný degradovať kolagén, fosfolipáza sa zas spoluzúčastňuje na poškodzovaní membrán a vytvára lézie (hlavne v pľúcach pacientov) [31], [32], [33]. Drvivá väčšina klinických izolátov *Cryptococcus neoformans* má pozitívny ureázový test. Mutantné kmene, u ktorých bol gén pre ureázu poškodený, boli oproti divokým kmeňom so zachovanou ureázovou aktivitou významne menej virulentné [32], [34].

Okrem vyššie uvedených faktorov, ktoré predurčujú mieru patogenity jednotlivých kmeňov, je pre vznik ochorení dôležitá schopnosť kvasiniek existovať za podmienok hostiteľského prostredia (37 °C, 5 % CO₂, pH 7,3-7,4). Virulenciu tiež ovplyvňuje párovací typ daného kmeňa [35].

2.1.4.1 Kryptokokózy

Všeobecne sa ochorenia zapríčinené zástupcami rodu *Cryptococcus* označujú ako kryptokokózy. Napriek tomu, že väčšina druhov iba saprofyticky perzistuje v prostredí,

sporadicky niektoré z nich vyvolávajú infekcie [36], [37]. Najčastejšie a najviac problematické sú tie ochorenia, na ktorých participuje *Cryptococcus neoformans* prípadne *Cryptococcus gatti*. Hlavnou rizikovou skupinou sú predovšetkým HIV pozitívni jedinci a osoby s oslabenou imunitou [12], [38].

Najzávažnejším prejavom kryptokokózy je postihnutie centrálnej nervovej sústavy vo forme meningitídy alebo meningoencefalitídy. Ak nie je liečená, v 100 % prípadov končí úmrtím [39], [40].

Kvasinky rodu *Cryptococcus* môžu ďalej vyvolávať pľúcne a kožné ochorenia, zápaly urogenitálneho traktu alebo očí [7], [12], [41].

Najväčším problémom pri liečbe kryptokokózy je častá rezistencia patogéna k antimykotikám [34].

2.2 *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C.E. Skinner (1950)

Fylogenetické umiestenie: rad Tremellales, skupina *Bulleromyces* [5].

Synonymá v roku 2010 [5]:

Torula laurentii Kufferath (1920)

Torulopsis laurentii (Kufferath) Lodder (1934)

Rhodotorula laurentii (Kufferath) Hasegawa, Bonno et Yamauchi (1960)

Rhodotorula nites Mackenzie et Auret (1963)

Synonymá v roku 2000 a skôr [4], [1], [42]:

Chromotorula aurea (Saito) F.C. Harrison (1928)

Cryptococcus flavescens (Saito) S.E. Skinner (1947)

Cryptococcus laurentii (Kufferath) S.E. Skinner var. *flavescens* (Saito) Lodder et Kreger

Rhodotorula aurea (Saito) Lodder (1934)

Rhodotorula flavescens (Saito) Krasil'nikov

Rhodotorula laurentii (Kufferath) Hasegawa, Bonno et Yamauchi (1960)

Rhodotorula nites Mackenzie et Auret (1963)

Rhodotorula peneaus Phaff, Mrak et Williams (1952)

Torula aurea Saito (1922)

Torula flavescens Saito (1922)

Torula laurentii Kufferath (1920)

Torulopsis carnescens Verona et Luchetti (1936)

Torulopsis flavescens (Saito) Lodder (1934)

Torulopsis laurentii (Kufferath) Lodder (1934)

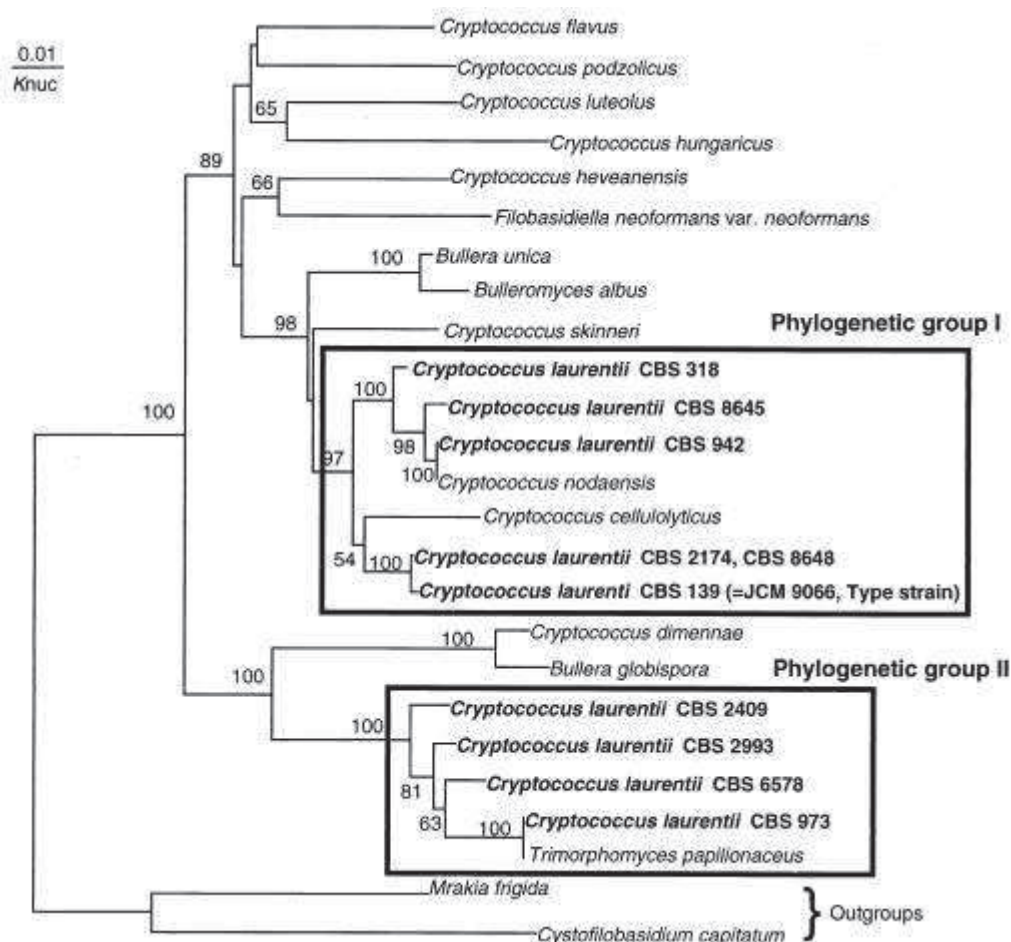
Typový kmeň:

CBS 139 pôvodne izolovaný z palmového vína z Konga (Kufferath, 1920) [4], [1], [5].

Systematika:

Cryptococcus laurentii bol na základe viacerých štúdií (proteomických štúdií, analýz genómu, zastúpenia mastných kyselín a.i.), ktoré u rôznych kmeňov tohto druhu dospeli k odlišným záverom (odlišné enzymatické profily, rôzne pomerné zastúpenie mastných kyselín v bunkách, veľké rozdiely v obsahu G + C párov), považovaný za kvasinku s pomerne veľkou vnútrodruhovou variabilitou [43], [44]. Pomocou sekvenovania niektorých oblastí genómu boli rozlíšené dve fylogenetické skupiny (**Obr. 2**) a prinajmenšom sedem taxónov, ktoré je možné považovať za samostatný druh [13]. Zo záverov nadväzujúcej štúdie zahŕňajúcej pätnásť kmeňov z tzv. „*Cryptococcus laurentii* skupiny“ je zrejmé, že situácia okolo taxonomického statusu tohto druhu je veľmi zložitá a jeho súčasná klasifikácia nie je definitívna [45]. Niektoré novo popisované druhy sa navyše nedajú od *Cryptococcus laurentii* odlíšiť tradičnými identifikačnými metódami a dajú sa charakterizovať len na základe molekulárne biologických dát [46].

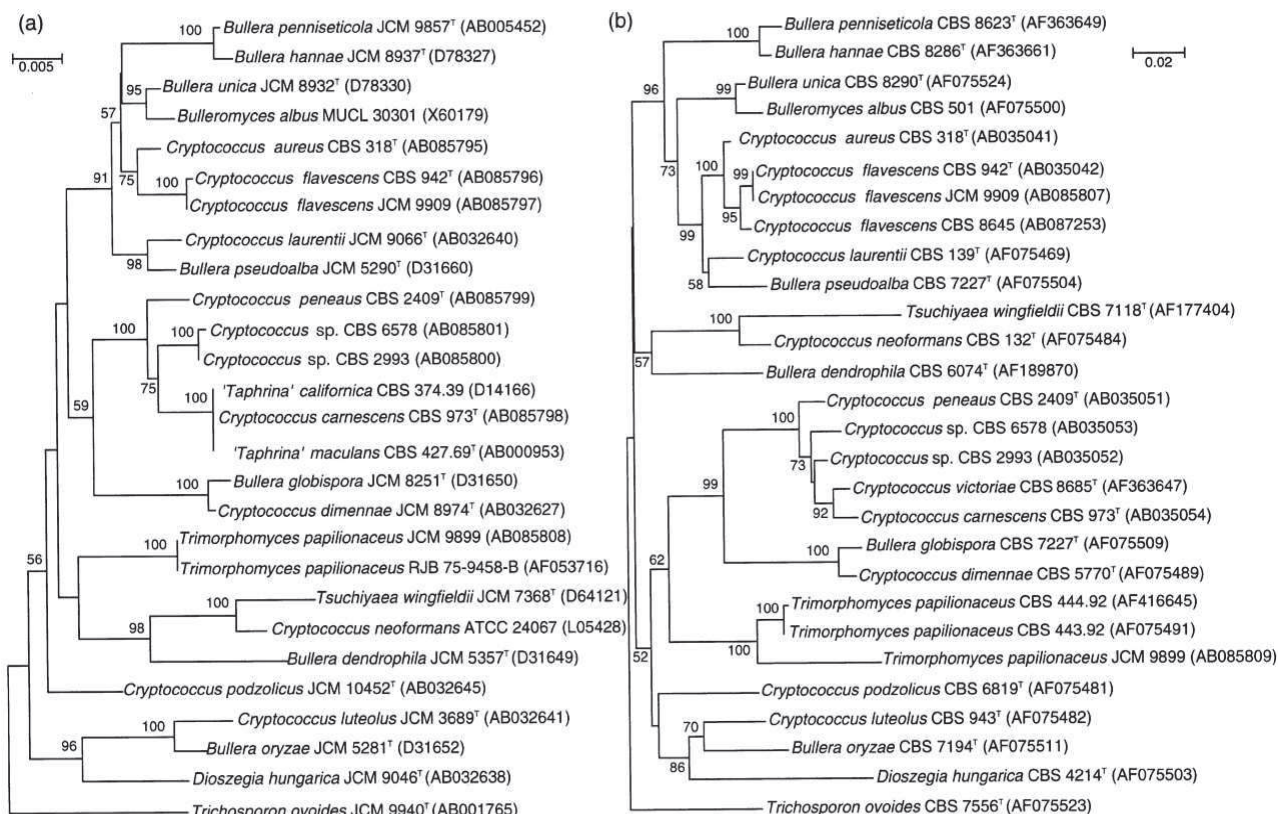
Súčasnú taxonomickú hranicu *Cryptococcus laurentii* boli vymedzené na základe sekvenčných analýz 18S rDNA, D1/D2 regiónu 26S rDNA a ITS regiónov (internal transcribed spacer regions) uskutočnených Takashima et al. (v roku 2003), ktorí segregovali štyri z bývalých synonym: *Cryptococcus aureus*, *Cr. carnescens*, *Cr. flavescens* a *Cr. peneaus* [45]. Zistilo sa, že *Cryptococcus laurentii* spolu s *Cr. flavescens* a *Cr. aureus* patrí do fylogenetickej skupiny I a *Cryptococcus carnescens* spolu s *Cr. dimennae*, *Cr. peneaus*, *Cr. victoriae* a *Bullera globispora* patrí do fylogenetickej skupiny II [45] (**Obr. 3**). Sekvenčná analýza D1/D2 domén LSU rRNA génu a ITS 1 + 2 regiónov zaradili *Cr. laurentii* do čeľade *Bulleromyces* [5].



Obr. 2: Fylogenetický strom založený na čiastočnej sekvenácii 28S rRNA vybraných kvasiniek rodu *Cryptococcus* [13]. Vývojové rozdiely boli počítané podľa Kimurovho parametra [47]. Použité kmene sú uvedené v **Tab. 1**.

Tab. 1 [45]

Kmeň	Zdroj
<i>Cryptococcus laurentii</i>	
JCM 9066	Palmové víno; typový kmeň <i>Torula laurentii</i>
CBS 2174	Nádor
CBS 8648	Plúca
<i>Cryptococcus aureus</i>	
CBS 318	Atmosféra; typový kmeň <i>Torula aurea</i>
JCM 5945	Kvety
<i>Cryptococcus flavescens</i>	
CBS 942	Atmosféra, typový kmeň <i>Torula flavescens</i>
CBS 8645	Cerebrospinálna tekutina AIDS pacienta
JCM 9909	Pšenica
JCM 9910	Pšenica
JCM 9911	Pšenica
JCM 9912	Pšenica
<i>Cryptococcus carnescens</i> CBS 973	Hrozno; typový kmeň <i>Torulopsis carnescens</i>
<i>Cryptococcus peneaus</i> CBS 2409	Kreveta; typový kmeň <i>Rhodotorula peneaus</i>
<i>Cryptococcus</i> sp. CBS 2993	Plúca
<i>Cryptococcus</i> sp. CBS 6578	Morská voda



Obr. 3: Fylogenetický srom *Cryptococcus laurentii* a príbuzných druhov založený na porovnávaní sekvencií 18S rDNA (a) a D1/D2 regiónov 26S (b) [45]. Vývojové rozdiely boli počítané podľa Kimurovho parametra [47].

Všeobecná charakteristika:

Cr. laurentii je ubikvitný mikroorganizmus s celosvetovým rozšírením. Vyskytuje sa v rôznych typoch prostredí, vrátane pôdy, vzduchu, vody (i morskej), hmyzieho trusu, muškátového či palmového vína, listov rastlín, kvasiaceho ovocia, hnijúceho dreva, klinických zdrojov, výrobkov z bravčového mäsa a bol dokonca izolovaný aj z antarktických lišajníkov [5], [48], [49], [50], [51], [52].

Kvasinka má guľovitý alebo elipsovitý tvar. Môže vytvárať krátke retiazky z troch až štyroch buniek, ale väčšinou sú bunky buď jednotlivé alebo v pároch (**Obr. 4**). Na pevných pôdach tvorí kolónie s hladkým a lesklým povrchom so slizovitou textúrou. Tieto kolónie môžu byť smotanovo, žlté, oranžovo až svetlo sfarbené s celým alebo laločnatým okrajom. Rozmery buniek sa pohybujú od 3,5–11×3–7,5 µm. Pseudomycélium *Cr. laurentii* nevytvára či iba rudimentárne [4], [1], [42], [5].

Jedná sa o alkalo-tolerantnú kvasinku, keďže je schopná rásť i pri pH 10 a optimálna teplota pre jej rast je 25 °C [5].

Hoci životný cyklus tejto kvasinky nebol doteraz úplne objasnený, boli zo zŕn pšenice a kukurice izolované kmene *Cr. laurentii* s opačnými párovacími typmi [5]. Po vzájomnej konjugácii buniek týchto kmeňov bola pozorovaná tvorba pravého mycélia [53]. Podobne ako *Cr. neoformans* vytvára *Cr. laurentii* medzi jednotlivými bunkami pravého mycélia septá bazidiomycetového typu [54]. Niektoré práce naznačujú, že *Cr. laurentii* je blízko príbuzný

určitým zástupcom rodu *Tremella* a môže predstavovať jedno zo štádií ich životného cyklu [44].

Biotechnológie:

Izoláty z Južnej Afriky vykazujú dobrú epoxidhydrolázovú aktivitu s prednostnou hydrolýzu (S)-epoxidov z ($\pm$)-2,2-disubstituovaných epoxidov [55]. Veľké výnosy nenasýtených mastných kyselín (kyseliny olejovej, linolovej) boli produkované izolátmi z Antarktídy [56].

Okrem melanínu, ktorý v porovnaní s *Cr. neoformans* vytvára v oveľa menšej miere [50], [26], [29], bola u *Cr. laurentii* popísaná syntéza karotenoidného pigmentu (plektaniaxantínu) [57]. Ako ďalší zástupcovia rodu produkuje *Cr. laurentii* pri nízkom pH kultivačného média extracelulárne polysacharidy [58].

Poľnohospodárstvo a potraviny:

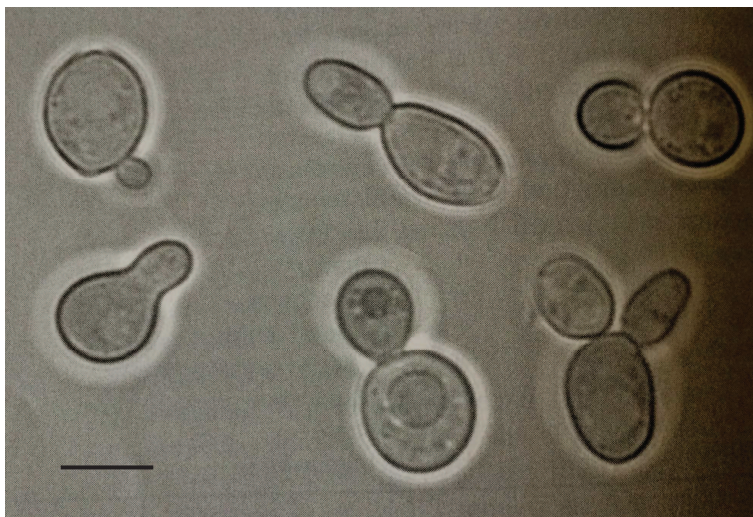
Cryptococcus laurentii sa často využíva ako modelový organizmus pri štúdiu antagonistického účinku voči plesniam (*Penicillium expansum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*). Hlavným dôvodom tohto výskumu je možná biologická ochrana skladovaného ovocia pred pokazením a hnitím. Výhodou takéhoto ošetrovania plodov je eventuálne nahradenie fungicídov, ku ktorým niektoré plesne získali rezistenciu. Antagonistický efekt kvasinky pravdepodobne spočíva v schopnosti rýchlo sa rozmnožovať v mieste poškodenia plodu a v kompetícii o živiny a priestor [59], [60], [61], [62]. Zistilo sa, že prítomnosť tejto kvasinky znižuje schopnosť adhézie a germinácie konídií *Botrytis cinerea*, významnej plesne zapríčiňujúcej pozberové znehodnocovanie plodín [5].

Okrem negatívneho účinku na eukaryotické organizmy (plesne) *Cr. laurentii* produkuje zlúčeniny s antibakteriálnou aktivitou, čím negatívne ovplyvňuje i prokaryotické mikroorganizmy [63].

Zdravotníctvo:

Cryptococcus laurentii bol izolovaný z rôznych klinických zdrojov (napr. z tiel pacientov trpiacich na AIDS, z nádorov, z pľúc) [5] a môže byť príčinou povrchovej kryptokokózy, zápalov postihujúcich vnútorné orgány [64] či sepsy [65]. Aj keď boli ochorenia vyvolané touto kvasinkou doteraz pomerne dobre liečiteľné, sú už popísané prípady izolátov rezistentných k niektorým antitumorkovým [66], [67].

Okrem človeka môže byť *Cr. laurentii* patogénny aj pre iné druhy živočíchov, tieto prípady sú však veľmi ojedinelé [68]. Kvôli taxonomickému prerozdeleniu z roku 2003 [45] sa nedá jednoznačne tvrdiť, že vo všetkých dovtedy publikovaných prácach je skutočným pôvodcom ochorenia *Cryptococcus laurentii*. Identita izolovaných kmeňov sa nedá spätne verifikovať pomocou moderných identifikačných techník, keďže väčšina izolátov nebola uchovaná. Preto časť klinických publikácií môže pojednávať o iných druhoch v rámci *Cryptococcus laurentii* skupiny ako napr. o *Cryptococcus flavescens* [5], [13].



Obr. 4: Bunky *Cryptococcus laurentii* CBS 139 vľavo v dusíkatej kvasinkovej zásade s 5% glukózou, dĺžka úsečky = 10 μ m [5].

2.3 Ďalšie významné druhy *Cryptococcus laurentii* skupiny

Ako už bolo uvedené vyššie *Cryptococcus laurentii* skupina sa delí na dve fylogenetické skupiny. Okrem typového *Cryptococcus laurentii* sa do prvej fylogenetické skupiny radia *Cr. aureus* a *Cr. flavescens*. Hlavní predstavitelia druhej fylogenetické skupiny sú: *Cryptococcus carnescens*, *Cr. dimennae*, *Cr. peneaus*, *Cr. victoriae* a *Bullera globispora*.

2.3.1 *Cryptococcus aureus* (Saito) Takashima, Sugita, Shinoda a Nakase (2003)

Fylogenetické umiestenie: rad Tremellales, skupina *Bulleromyces* [5]

Synonymá v roku 2010 [5]:

Torula aurea Saito (1922)

Chromotorula aurea (Saito) F.C. Harrison (1928)

Rhodotorula aurea (Saito) Lodder (1934)

Typový kmeň:

CBS 318 pôvodne izolovaný zo vzduchu v Tokiu, Japonsko (K. Saito, 1922) [5].

Systematika:

Kvasinka *Torula aurea* bola považovaná za synonymum *C. laurentii* [4],[1] [42]. Analýzy bunkových proteínov [69] a rRNA génové sekvenácie [70] poukázali na to, že sa môže jednať o odlišný druh [5]. Na základe SSU (small subunit) a D1/D2 LSU (large subunit) génovej sekvenčnej analýzy bola *Torula aurea* v roku 2003 uznaná ako samostatný druh pod názvom *Cr. aureus* a zaradená do fylogenetické skupiny I, spolu s *Cr. flavescens* a *Cr. laurentii* [45].

Všeobecná charakteristika:

Druh *Cr. aureus* je známy zo vzduchu a kvetov v Japonsku. Môže sa však vyskytovať i v morských ekosystémoch, o čom svedčia nálezy v sedimentoch z Juhočínskeho mora [5]. Bunky sú prevažne elipsoidné, cylindrické, subglobulárne. Typické je polárne pučanie so sympodiálnou polyferáciou. Bunky sa nemusia od seba oddeliť a môžu tvoriť široko rozvetvené pseudomycélium. Rozmery buniek sa pohybujú od 6–23×2–6 µm. Kolónie sú lesklé, svetlo krémové, maslové, hladké s plným okrajom [5].

Fermentácia absentuje. Nie je schopný asimilovať etanol a erytritol čím sa líši od *Cryptococcus laurentii*.

Biotechnológie:

U izolátov zo sedimentov Juhočínskeho mora bola preukázaná inulinázová aktivita [71].

2.3.2 *Cryptococcus flavescens* (Saito) C.E. Skinner (1950)

Fylogenetické umiestenie: rad Tremellales, skupina *Bulleromyces* [5]

Synonymá v roku 2010 [5]:

Torula flavescens Saito (1922)

Torulopsis flavescens (Saito) Lodder (1934)

Cryptococcus flavescens (Saito) C.E. Skinner (1947)

Cryptococcus laurentii (Kufferath) C.E. Skinner var. *flavescens* (Saito) Lodder et al. (1952)

Cryptococcus nodaensis (Saito et al. 1999) nom. inval. (bez latinského pomenovania, synonymum bolo stanovené na základe D1/D2 a ITS sekvenácie [45]).

Typový kmeň:

CBS 942 pôvodne izolovaný zo vzduchu v Tokiu, Japonsko (K. Saito, 1922) [5].

Systematika:

Cryptococcus flavescens bol donedávna považovaný za synonymum *Cr. laurentii* [42]. Podobne ako tomu bolo v prípade druhu *Torula aurea*, až následné proteomické štúdie a génové analýzy preukázali, že sa jedná o samostatný druh patriaci do fylogenetickej skupiny I [5].

Všeobecná charakteristika:

Kvasinky druhu *Cryptococcus flavescens* boli izolované z viacerých zdrojov. Typový kmeň bol izolovaný zo vzduchu. Dobre charakterizované sú izoláty z tropických rastlín v Indonézii (CBS 4918, CBS 4919), z pšenice či kukurice v USA, z cerebrospinálnej tekutiny pacienta trpiaceho na AIDS [5].

Bunky sú prevažne subglobulárneho tvaru o veľkosti približne $8-17 \times 7-14 \mu\text{m}$. Občas sa môžu vyskytovať hrubostenné bunky podobne chlamýdospóram, ktoré klíčia s krátkym filamentom do $25 \mu\text{m}$. Kolónie sú matné, maslové až šedo-krémové. Pučanie je bipolárne alebo na sterigme, pričom bunky môžu adherovať a tvoriť krátke pseudomycélium.

Tento druh nie je schopný fermentácie. Od *Cr. laurentii* sa líši neschopnosťou asimilácie kreatínu a D-glukóзамínu.

Biotechnológie:

Typový kmeň *Cr. nodaensis* (CBS 101036) je patentovaný ako producent osmotolerantnej a termostabilnej glutaminázy (US Patent US006063409A; Sato et al. 1999). U izolátu CBS 942 bola pozorovaná produkcia acidických extracelulárnych polysacharidov, ktoré obsahujú D-xylózu, D-manózu, D-glukurónovú kyselinu a O-acetyl [5].

2.3.3 *Cryptococcus carnescens* (Verona a Luchetti) Takashima et al. (2003)

Fylogenetické umiestnenie: rad Tremellales, skupina *victoriae* [5]

Synonymum v roku 2010: *Torulopsis carnescens* Verona a Luchetti (1936) [5]

Typový kmeň:

CBS 973 pôvodne izolovaný z hrozna, Taliansko [5].

Systematika:

Termín *Torulopsis carnescens* bol do roku 2000 považovaný za synonymum druhu *Cryptococcus laurentii* [4], [1], [42]. Avšak na základe nukleotidových sekvencií LSU rRNA génu D1/D2 domén a ITS regiónov sa už predpokladalo, že sa jedná o samostatný druh [70]. V roku 2003 sa tento predpoklad potvrdil a bol uznaný nový druh, *Cryptococcus carnescens*. Sekvenácia SSU rRNA génu preukázala 100% príbuzenstvo tohto druhu s druhmi *Taphrina maculans* CBS 427,69 a *Taphrina californica* CBS 374,39, ktoré boli mylne identifikované ako bazídiomycetové kvasinky [5], [45].

Cryptococcus carnescens patrí spolu s *Cr. dimennae*, *Cr. peneaus*, *Cr. victoriae* a *Bullera globispora* do fylogenetickej skupiny II a D1/D2 sekvencie umiestnili tento druh blízko *Cryptococcus victoriae* [45].

Všeobecná charakteristika:

Kmene druhu *Cr. carnescens* boli izolované z viacerých zdrojov. Typový kmeň CBS 973 bol izolovaný v Taliansku z muškátového hrozna (Verona a Luchetti, 1936). Ďalšie izoláty pochádzajú z morskej vody v Portugalsku, lesnej pôdy v Rakúsku a kmeň EX-F 1589 bol izolovaný z ľadovca na Špicbergoch [5].

Cryptococcus carnescens je fylogeneticky príbuzný nie len s *Cr. laurentii*, ale aj inými druhmi rodu *Cryptococcus* patriacimi do skupiny *victoriae*, od ktorých je len ťažko

odlišiteľný (najlepšie pomocou porovnania D1/D2 a/alebo ITS sekvencií). Od *Cr. laurentii* sa líši tým, že rastie pri 30 °C a nie je schopný asimilovať etanol a keratín [5].

Nefermentuje, nie je známe biotechnologické či poľnohospodárske využitie a nie sú známe ani ochorenia spôsobené týmto mikroorganizmom. Pseudomycélium nebolo pozorované [5].

2.3.4 *Cryptococcus peneaus* (Phaff, Mrak a Williams) Takashima et al. (2003)

Fylogenetické umiestenie: rad Tremellales, skupina *victoriae* [5]

Synonymum v roku 2010: *Rhodotorula peneaus* Phaff, Mrak a Williams (1952) [5]

Typový kmeň:

CBS 2409 izolovaný z povrchu krevety z Mexického zálivu (Phaff et al. 1952) [5].

Systematika:

Rhodotorula peneaus bola do roku 2000 považovaná za synonymum *Cr. laurentii*, ale tak ako tomu bolo i v predchádzajúcich prípadoch (viď. vyššie), na základe podrobnejších štúdií sa začalo uvažovať, že by sa mohlo jednať o samostatný druh. V roku 2003 na základe sekvenčných analýz rRNA génov (SSU a D1/D2 domény LSU) bola skutočne uznaná ako druh pod názvom *Cryptococcus peneaus*. Tento relatívne nedávno klasifikovaný druh sa radí do fylogenetickej skupiny II [5], [45].

Všeobecná charakteristika:

Bunky sú elipsoidné alebo cylindrické o veľkosti 5–8×2–3,8 μm. Pučanie je enteroblastické, polárne a zanecháva jazvy. Kolónie sú slabo konvexné, lesklé, svetlo žlté-hnedé, hladké, s plným miestami undulujúcim okrajom. Filamenty ani pseudomycélia neboli pozorované. Nefermentuje, nie je známe žiadne biotechnologické či poľnohospodárske využitie a nie sú známe ani ochorenia spôsobené touto kvasinkou. *Cr. peneaus* sa od *Cr. laurentii* líši tým, že nie je schopný asimilovať etanol a keratín. Fyziologicky je neodlišiteľný od ostatných druhov rodu *Cryptococcus* patriacich do skupiny *victoriae*, najlepšie odlíšenie sa dosahuje pomocou porovnania D1/D2 sekvencií [5].

2.3.5 *Cryptococcus victoriae* M.J. Montes, et al. (1999)

Fylogenetické umiestenie: rad Tremellales, skupina *victoriae* [5]

Typový kmeň:

CBS 8685 izolovaný z pôdy zo zálivu vo Viktóriinej zemi na Antarktíde [5].

Systematika:

Systematika druhu *Cryptococcus victoriae* nie je jednoznačná. Sekvenčná analýza D1/D2 domén LSU rRNA génu priradila *Cr. victoriae* ku *Cr. dimennae* a *Bullera globispora*, zatiaľ

čo výsledky ITS sekvenčnej analýzy zaradili tento druh medzi *Cr. luteolus*, *Bullera variabilis*, *B. coprosmaensis*, *B. oryzae*, *B. derxii*, *B. sinensis*, dva druhy rodu *Dioszegia* a *Holtermannia corniformis* [72]. O dva roky neskôr Bayesianova analýza D1/D2 domén LSU rRNA génu umiestnila *Cr. victoriae* do skupiny s *Trimorphomyces papilionaceus*, *B. globispora* a *Cr. dimennae* [73]. Na základe porovnania dodatočných D1/D2 sekvencií bol *Cr. victoriae* zaradený do fylogenetickej skupiny II, do ktorej patria okrem iných aj druhy, ktoré boli v minulosti považované za synonymá *Cr. laurentii* (*Cr. carnescens*, *Cr. peneaus*) [45].

Všeobecná charakteristika:

Cryptococcus victoriae je známy z viacerých pôdných zdrojov z Antarktídy, Aljašky, ale i iných lokalít. Okrem pôdy bol izolovaný z nektáru viacerých kvitnúcich rastlín (Nemecko), z povrchu mladých jabĺk (Holandsko) a iných zdrojov [5].

Bunky sú elipsoidné až cylindrické, $5-9 \times 2,8-4 \mu\text{m}$ veľké. Pučanie je polárne, môže sa tvoriť pseudomycélium a krátke filamenty. Farba kolónií je lesklá, krémová, svetložltá. Okraj je plný a hladký [5].

Fermentácia absentuje, biotechnologické využitie nie je známe. V poľnohospodárstve sa považuje za škodcu, pretože spolu s inými mikroorganizmami prispieva k tvorbe červenohnedých až hrdzavých flakov na zelených jablkách (odroda Elstar), čím znižuje ich ekonomickú hodnotu [74].

Fyziologicky sa od *Cr. laurentii* líši neschopnosťou asimilovať etanol, DL-laktát a kreatín a rásť pri 30 °C. Od zástupcov fylogenetickej skupiny II ho nie je možné odlíšiť na základe fyziológie, dá sa však odlíšiť pomocou porovnania D1/D2 a/alebo ITS sekvencií [5].

2.4 Identifikácia mikroorganizmov pomocou hmotnostnej spektrometrie

Mikrobiológovia identifikujú a taxonomicky zaraďujú neznáme mikroorganizmy na základe rôznych metód a postupov. Tradičné postupy sú založené na fenotypických testoch, histochemickom farbení, charakterizácii kultúr a rastu, stále sa používa klasické triedenie na základe morfológických znakov (makroskopické a mikroskopické metódy), u baktérii je bežné triedenie na G^+ a G^- baktérie farbením podľa Grama. Ďalej sa mikroorganizmy z čistej kultúry identifikujú biochemickými metódami (kvasné testy), kedy sa testuje zdroj uhlíka, zdroj dusíka, sleduje sa enzýmová aktivita a tvorba plynov [75]. Takéto triedenie je veľmi časovo náročné a nemusí byť vždy presné. S rozvojom poznatkov z genetiky a molekulárnej biológie sa do popredia dostali metódy priameho sekvenovania PCR produktov (amplifikované oblasti génov pre ribozomálne podjednotky). V laboratórnej praxi sa analyzuje skoro výlučne len časť genómu (nikdy nie celá genetická informácia), čo môže viesť do identifikácie určité nepresnosti [76].

Rýchla a spoľahlivá identifikácia mikroorganizmov bez rozsiahlej manipulácie je hlavným cieľom v environmentálnej a klinickej mikrobiológii [77]. Analýza biologických vzoriek bude vždy kvôli ich veľkej rozmanitosti a komplexnosti náročná [78]. Včasná detekcia a charakterizácia mikroorganizmov (najmä patogénnych) môže pomôcť minimalizovať zdravotné riziká a zabrániť ďalšiemu šíreniu nákazy. Z týchto dôvodov sa neustále hľadajú a testujú nové metódy, ktoré by umožnili rýchlu, cenovo dostupnú a presnú identifikáciu mikroorganizmov, pokiaľ možno nielen na úrovni druhu, ale aj variety. Vzhľadom k tomu, že väčšinu z požiadaviek, ktoré sa kladú na moderné metódy, spĺňa hmotnostná spektrometria

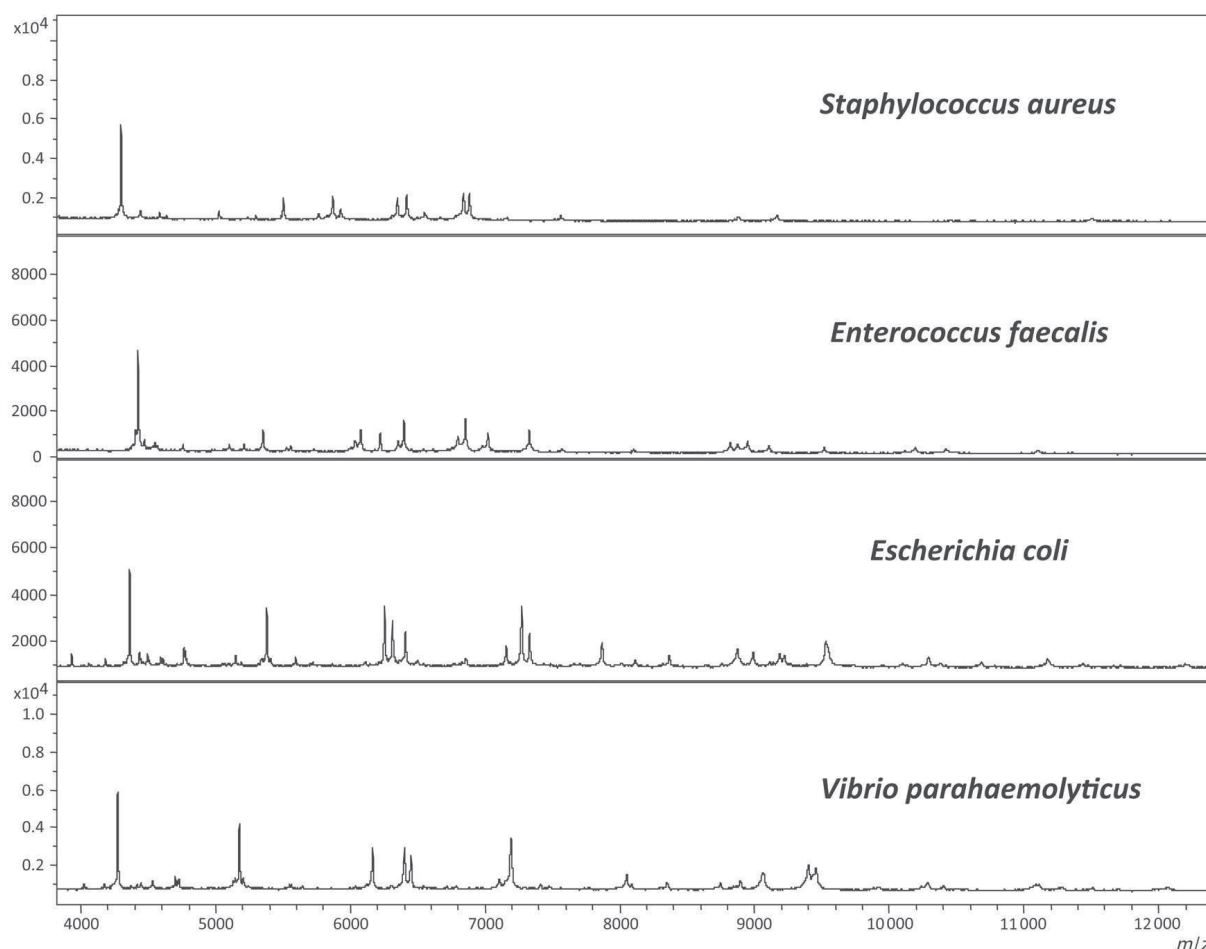
(MALDI – TOF MS), čoraz častejšie sa táto technológia používa i na identifikáciu a charakterizáciu mikroorganizmov [77].

MALDI – TOF hmotnostná spektrometria je ekonomicky výhodná, rýchla a spoľahlivá metóda na identifikáciu a charakterizáciu baktérií, kvasiniek i plesní [79], [77].

Nadalej však zostáva vyriešiť problém, ako z komplexnej biologickej matrice získať natoľko purifikovanú vzorku, ktorá by mohla byť podrobená MS analýze a pritom aby neboli purifikačné kroky časovo náročné a zložité. Boli vyvinuté afinitné techniky založené na biochemických, chemických a fyzikálnych interakciách s cieľovými bunkami. Často sa používajú magnetické nanočastice, pomocou ktorých dokážeme odseparovať mikroorganizmy od zvyšnej matrice. MS sa zvykne kombinovať aj s PCR technikami, kedy sa pomocou hmotnostnej spektrometrie analyzujú PCR produkty [78]. Dobré známa je imunomagnetická separačná technika, pri ktorej sú magnetické častice pokryté protilátkami, na ktoré sa cielene naviažu bunky a pôsobením magnetického poľa ich dokážeme oddeliť od zvyšku vzorky. Po separácii buniek je možná ich identifikácia pomocou MALDI – TOF MS [80]. Nanočastice zlata enkapsulovaného do manózy sú schopné kovalentnej interakcie s pilami *Escherichia coli* [81]. Bakteriálne bunky je možné z komplexnej biologickej zmesi zakoncentrovať a purifikovať aj imobilizáciou na lektínom pokryté sklenené doštičky [82].

Možná je však i priama analýza mikroorganizmov pomocou MALDI-MS, ktorá ponúka početné výhody: rýchlosť, nízke detekčné limity, umožnenie zjednodušenia hmotnostných spektier detekciou prevažne len jednomocných iónov a toleranciu voči kontamináciám látkami o relatívnej molekulovej hmotnosti do 3 000. Proteínový profil bunky poskytuje taxonomicky charakteristické hmotnostné spektrum („proteínový odtlačok prstu“), ktoré môže byť použité na rozlíšenie mikroorganizmov na úrovni rodu, druhu, kmeňa a dokonca i variety, napriek tomu, že nie je detekovaný celý mikrobiálny proteóm, ale len jeho malá časť. Priama analýza intaktných bakteriálnych buniek pomocou MALDI – TOF hmotnostnej spektrometrie je často používaná na určovanie druhov a poddruhov v mnohých laboratóriách klinickej mikrobiológie [83]. **Obr. 5** zobrazuje štyri MALDI –TOF hmotnostné spektrá získané v lineárnom móde priamou analýzou živých bakteriálnych buniek izolovaných z čistých kultúr (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* a *Vibrio parahaemolyticus*); každá vzorka obsahovala 10^7 CFU baktérií. Vďaka odlišnosti proteínového profilu testovaných baktérií sa líšia aj ich MALDI spektrá, ktoré tak môžu slúžiť na rozpoznávanie daných mikroorganizmov porovnaním s referenčnými spektrami z charakterizovanej knižnice [77], [84].

Identifikácia a biotypizácia mikroorganizmov pomocou MALDI-TOF MS sa zdá byť veľmi úspešná a je posudzovaná mnohými autormi [83], [85], [86].



Obr. 5: MALDI spektrá získané priamou analýzou intaktných bakteriálnych buniek *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* a *Vibrio parahaemolyticus* [77].

2.4.1 Identifikácia kvasiniek pomocou hmotnostnej spektrometrie

Kvasinky predstavujú dôležitú polyfyletickú skupinu organizmov. Identifikácia kvasiniek v klinických laboratóriách je väčšinou podstatne zdĺhavejšia ako identifikácia baktérií. Obmedzenia morfológických pozorovaní, laboratórna prácnosť a nákladnosť molekulárnych metód, ktoré sa v súčasnosti používajú na identifikáciu a charakterizáciu kvasiniek a plesní, viedli k vývoju rýchlych postupov založených na MS analýze [87], [88].

Dhiman a kol. vo svojej štúdii [79] hodnotili úspešnosť identifikácie kvasiniek ($n = 261$) pomocou hmotnostného spektrometra MALDI Biotyper 2,0 Microflex LT (Bruker Daltonics, Inc., Billerica, MA). Kolónie kvasiniek boli najprv premyté v 1 ml 70% etanolu, po centrifugácii bol odstránený etanol a k sedimentu pridávali 50 μ l 70% kyseliny mravečej a 50 μ l acetonitrilu. Suspenzia bola centrifugovaná a 2 μ l supernatantu boli použité na analýzu nanesením na 24-spotovú BigAnchor ocel'ovú platňu (Bruker Daltonics, Inc.). Po vysušení pridávali 2 μ l MALDI matrice (kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová). Získané spektrum každej vzorky bolo porovnané s 3 740 hmotnostnými spektrami charakterizovaných mikroorganizmov z Bruker knižnice (Reference Library version 3,0). Z 261 izolátov MALDI Biotyper správne identifikoval 92,0 % so skóre $\geq 2,0$ a 96,3 % so skóre $\geq 1,8$ [79]. K podobným výsledkom dospel i Marklein a kol. [88] a Stavenson a kol. [89].

Okrem dobrých výsledkov analýzy je zaujímavá aj jej cena a časová náročnosť. Napriek tomu, že sa používajú chemikálie vysokej čistoty, ich cena je približne \$0,50/izolát. Laboratórna príprava zaberie v priemere asi 5,1 min/izolát [79]. Celkový čas analýzy (príprava vzorky + vlastná spektrálna analýza aj s vyhodnotením) zaberie približne 15 min na jeden spot [89]. Tieto hodnoty sú nižšie ako v prípade iných dnes používaných metód (biochemické, molekulárno-biologické) a sú porovnateľné s inými štúdiami, a to nielen zaoberajúcimi sa kvasinkami, ale i baktériami [83], [90], [91]. Týmto sa dá jednoznačne deklarovať, že MALDI –TOF MS je rýchla, lacná a spoľahlivá metóda vhodná na identifikáciu mikroorganizmov či už prokaryotických alebo eukaryotických.

Výhody tejto metódy sú využívané predovšetkým v laboratóriách klinickej mikrobiológie, kde je potrebné veľmi rýchlo a spoľahlivo analyzovať biologickú (najčastejšie ľudskú) vzorku, zistiť či je kolonizovaná mikroorganizmami a o aké mikroorganizmy sa jedná.

Kolečka a kol. prehlásili, že implementácia systému MALDI-TOF MS ako rutinného identifikačného nástroja prispeje k správnej identifikácii kvasiniek rodu *Malassezia* s minimálnym laboratórnym úsilím a s krátkou dobu analýzy, čo je obzvlášť dôležité pre rýchlu identifikáciu týchto kvasiniek ako pôvodcu kožných ochorení a nozokomiálnych nákaz [92].

Vysokocitlivá druhová identifikácia kvasiniek hmotnostnou spektrometriou je v súčasnosti možná len z čistých kultúr [92]. Boli však vyvinuté postupy na analýzu mikroorganizmov (*Candida* spp.) priamo z krvných vzoriek pomocou MALDI – TOF MS, pretože rýchla detekcia a identifikácia inak ťažko identifikovateľných patogénov môže výrazne zvýšiť šance na prežitie u pacientov trpiacich na závažné ochorenia spôsobené mikroorganizmami (fungémia) [93], [94], [95], [96].

2.5 MALDI Biotyper Realtime Klasifikácia (RTC)

Ako už bolo spomenuté vyššie, identifikácia mikroorganizmov pomocou MALDI – TOF hmotnostnej spektrometrie (MALDI Biotyper) využíva inú metodológiu ako tradičné biochemické testy, ktoré stále tvoria základ väčšiny techník používaných na identifikáciu mikroorganizmov. MALDI Biotyper identifikuje baktérie, kvasinky a plesne analyzovaním ich intracelulárnych proteínov využívajúc hmotnostnú spektrometriu. Výsledkom je hmotnostné spektrum exprimovaných proteínov, ktoré sa porovnáva s referenčným spektrom z databázy [97].

Počiatočným materiálom je individuálna kolónia, ktorá sa prenesenie priamo na MALDI platňu, vysuší sa a pridá sa MALDI matrica. Organické rozpúšťadla, ktoré je zložkou matrice extrahuje mikrobiálne proteíny. Extrahované proteíny sú hlavne ribozomálne. Po kryštalizácii matrice je vzorka pripravená na analýzu [97]. Aby sa rozšíril počet mikroorganizmov, ktoré môžu byť identifikované pomocou MALDI analýzy, bolo vyvinutých viacero protokolov prispôbených na konkrétnu analýzu. Napr. vzorka môže byť pred extrakciou purifikovaná niekoľko-násobným premytím buniek v destilovanej vode alebo môže byť do postupu prípravy vzorky zahrnutý dodatočný extrakčný krok. Rozdiel môže byť aj v použitých chemikáliách (MALDI matrica, extrakčné činidlo a i.).

MALDI (matrix - assisted laser desorption/ionisation) TOF (Time of Flight) hmotnostná spektrometria tvorí základ MALDI Biotyper analýzy. Laser v MALDI – TOF hmotnostnom spektrometri ožiari zmes vzorky s matricou, matrica sa odparí a uvoľnia sa pozitívne nabité ióny v procese tzv. „mäkkej“ ionizácie. V tomto procese je rozhodujúca schopnosť matrice absorbovať UV žiarenie a prenášať protóny na extrahované proteíny [97].

Nabité proteíny (všetky so zhodným nábojom) sú elektrostaticky akcelerované a putujú do trubice s rýchlosťou, ktorá je proporciálna ich hmotnosti. Proteínové ióny s rozdielnymi

hmotnosťami dopadajú na detektor v rozdielnych časoch. Na základe nameranej doby letu iónu a známej definovanej dráhy letu sme schopný vypočítať rýchlosť iónu a tú konvertovať na molekulovú hmotnosť [97].

2.5.1 Generácia „molekulárneho odtlačku prstu“

MALDI Biotyper analýza generuje charakteristickú distribúciu hmotnosti a intenzity proteínov (hlavne ribozomálnych). Pretože toto hmotnostné spektrum je druhovo špecifické, predstavuje „molekulárny odtlačok prstu.“ Neznámy mikroorganizmus môže byť identifikovaný porovnaním jeho „odtlačku“ s tisíckami hmotnostných spektier z referenčnej databázy [97].

2.5.2 Výpočet hodnoty skóre

Na vzájomné porovnávanie dvoch hmotnostných spektier (napr. nameraného s referenčným) sa využíva porovnávací algoritmus, ktorý vypočíta tri separátne hodnoty pre tri základné charakteristiky oboch porovnávaných spektier [97].

1. Vyhodnotenie počtu zhodných signálov v referenčnom a nameranom (neznámom) spektre. Žiadnej zhode sa prisudzuje hodnota = 0, kompletnej zhode hodnota = 1.
2. Vyhodnotenie počtu blízkych signálov v referenčnom a nameranom (neznámom) spektre. Žiadnej zhode zodpovedá hodnota = 0, kompletnej zhode hodnota = 1.
3. Výpočet symetrie zhodných signálnych párov. Ak signály s vysokou intenzitou v nameranom spektre zodpovedajú signálom s vysokou intenzitou v referenčnom spektre, hodnota symetrie bude = 1. Ak všetky zhodné páry signálov nevykazujú symetriu, hodnota symetrie bude = 0.

Tieto tri hodnoty sú navzájom vynásobené a výsledok je normalizovaný na 1000. Hodnota skóre je dekadický logaritmus výsledku, t.j. dosahuje maximálne hodnotu 3 (= log 1000). Čím vyššia je hodnota skóre, tým je väčšia pravdepodobnosť zhody oboch spektier, t.j. väčšia pravdepodobnosť klasifikácie mikroorganizmu. Hodnoty ≥ 2 sa považujú za jednoznačnú identifikáciu a hodnota $\geq 1,8$ za pravdepodobnú identifikáciu. Pre rod *Cryptococcus* sa navrhlo zmeniť tieto hodnoty na 1,8 resp. 1,6 [98].

2.6 Hmotnostná spektrometria (MS)

Hlavným princípom tejto veľmi účinnej spektrometrickej analytickej metódy je vytváranie iónov z analyzovaných zlúčenín vhodnými metódami, takto ionizované analyty separovať v analyzátoch na základe pomeru hmotnosti a náboja (m/z) a následne ich detektorom zaznamenávať. Výsledným záznamom je dvojrozmerný graf závislosti intenzity nameraného signálu na pomere hmotnosti a náboja – hmotnostné spektrum. Spektrum môže byť prezentované vo forme priameho záznamu alebo v normalizovanej forme, kedy sú absolútne zastúpenia jednotlivých iónov prepočítané na relatívne zastúpenia vzhľadom k najintenzívnejšiemu iónu v spektre, čo uľahčuje vzájomné porovnávanie spektier [99], [100].

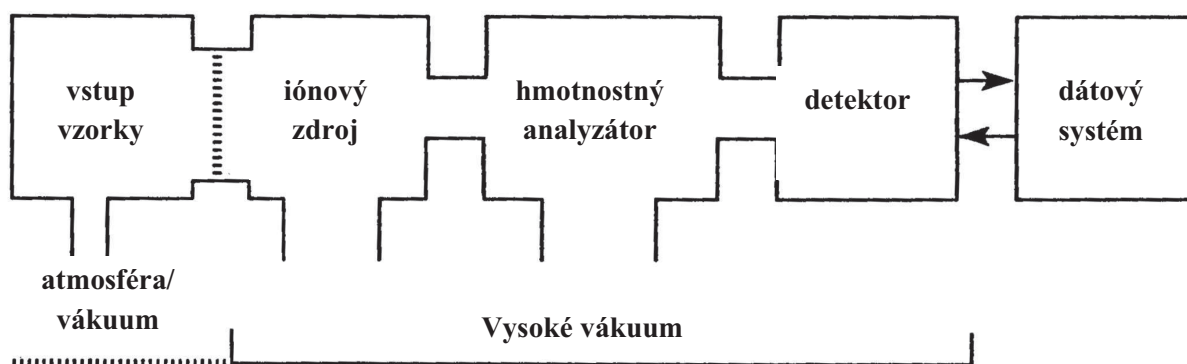
Hmotnostná spektrometria (MS – mass spectrometry) poskytuje informácie o štruktúre (napr. relatívna molekulová hmotnosť, prítomnosť určitých skupín alebo atómov), a preto sa využíva i na riešenie problémov v organickej chémii, biochémií, pri analýzach anorganických materiálov a povrchov tuhých látok, pri environmentálnych analýzach a v súčasnej dobe i v mikrobiológii a medicíne. Metóda MS sa bežne využíva na kvalitatívnu i kvantitatívnu chemickú analýzu, je vhodná prakticky pre všetky prvky a zlúčeniny, dá sa použiť od prvkovej analýzy až k analýze veľkých makromolekúl akými sú napr. proteíny. Ďalšími

výhodami tejto metódy sú nízke detekčné limity a nízka požiadavka na množstvo analyzovanej vzorky [101], [102], [103].

Zariadenie využívané na hmotnostnú spektrometriu, hmotnostný spektrometer (**Obr. 6**) sa skladá z iónového zdroja, v ktorom sa určitým spôsobom generujú ióny, hmotnostného analyzátor, ktorý slúži na separáciu iónov a detektora. Tieto časti pracujú v prostredí vysokého vákua. Nevyhnutnou súčasťou hmotnostného spektrometra je aj vyhodnocovacie zariadenie (počítač s vhodným softvérovým vybavením, pričom počítač slúži aj ako riadiaca jednotka) [99]. Všeobecná schéma hmotnostného spektrometra je na (**Obr. 7**).



Obr. 6: Hmotnostný spektrometer Bruker UltrafleXtreme.



Obr. 7: Všeobecná schéma hmotnostného spektrometra [99].

2.6.1 Ionizácia v MS

Na produkciu iónov sa v dnešnej dobe v MS používa množstvo spôsobov. Pre molekuly, ktoré sa pri podmienkach analýzy nachádzajú v plynnom stave, je stále najpoužívanejším spôsobom *ionizácia prúdom elektrónov* (elektrónová ionizácia - EI). Ďalším typom je *chemická ionizácia* (CI) kedy sa molekula ionizuje reakciou s iónmi reakčného plynu (často

metánu). Používa sa i *ionizácia elektrickým polom* (FI), *desorpcia elektrickým polom* (FD), *ionizácia bombardovaním rýchlymi časticami* (FAB, SIMS) [100], [106].

Pri biotypizácii mikroorganizmov sa najbežnejšie používa *desorpcia laserom* (LD). Vzorka je bombardovaná fotónmi laseru, ktorý je umiestnený vnútri iónového zdroja. Energia absorbovaná povrchom pevnej vzorky pri ožiarení laserom spôsobuje odparovanie a ionizáciu. Lasery často pracujú v pulznom režime využívajúc vlnové dĺžky od oblasti UV do IČ (IR). UV-lasery emitujú pulzy trvajúce 3-10 ns, dĺžka pulzov pri IR-laseroch je 6-200 ns. Aplikácia krátkych pulzov je nevyhnutná pre náhlu abláciu povrchu vzorky. V prípade metódy MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) možno zvýšiť účinnosť desorpcie pridaním vhodných ionizujúcich látok k vzorke ako matrice (kyseliny nikotínová, α -kyano-4-hydroxyškoricová, sinapová, trans-ferulová a iné organické kyseliny; glycerol spolu s kovovým prášokom) [99], [106]. Kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová je vhodná na analýzu peptidov, glykánov a proteínov [104], [105]. Kyselina trans-ferulová sa využíva ako MALDI matrica pri analýzach proteínov i peptidov a kyselina sinapová sa okrem proteínov a peptidov používa aj na analýzu dendrimérov a fullerénov [105].

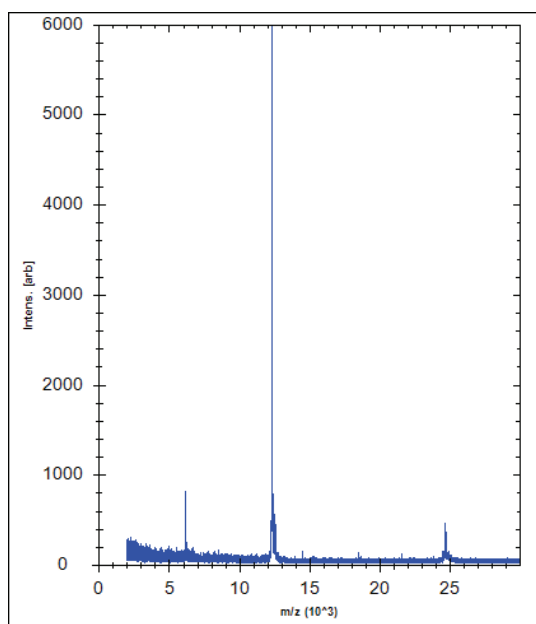
2.6.2 Analyzátory v MS

Úlohou analyzátora sekcie hmotnostného spektrometra je po urýchlčení rozdeliť ióny podľa pomeru ich hmoty voči náboju (m/z), teda fokusovať všetky ióny o zhodnom m/z do jedného ohniska detektora bez ohľadu na ich rozdielne kinetické energie. Na tento účel existuje niekoľko druhov analyzátorov, ktoré sa dajú rozdeliť na *statické* využívajúce statické magnetické a elektrické pole a *dynamické*, v ktorých sa separácia dosahuje časovo premenným elektromagnetickým polom. Najjednoduchším typom analyzátora je *magnetický analyzátor*, ktorý má nízku rozlišovaciu schopnosť vzhľadom k tomu, že ióny nie sú urýchlčené homogénne pred vstupom do magnetického pola a jednoduchá fokusácia magnetickým polom je nedokonalá. Najdôležitejším na analýzu plazmy je *kvadrupolový analyzátor*. Hmotnostný filter je tvorený štyrmi paralelnými kovovými tyčami, ktoré sú orientované do rohov štvorca. Tyče v diagonále sú navzájom spojené a pripojené k zdrojom jednosmerného a rádiokvénčného napätia [106]. Pohyb iónov vstupujúcich do analyzátora prebieha pozdĺž horizontálnej osy systému. Ióny priečne oscilujú v smere tyčí. Pri malej amplitúde kmitov môžu ióny prejsť cez systém tyčí. Pri väčších osciláciách ióny zasahujú jednu z elektród, kde sú neutralizované. Len ióny o určitom mernom náboji m/z sa vyhnú kolízii a dopadnú na detektor. Zmenami jednosmerného napätia a amplitúdy rádiokvénčného napätia za ich konštantného pomeru ďalšie a ďalšie ióny dopadajú na detektor, čím sa získa celé hmotnostné spektrum. [107]. Hlavnou výhodou kvadrupolového analyzátora je možnosť rýchlej zmeny napätia, čo umožňuje zvoliť rýchly sken a mnohonásobne zaznamenať hmotnostné spektrá počas elúcie veľmi úzkych chromatografických pík. Ďalšou výhodou je pomerne jednoduchá konštrukcia, čo sa prejaví v relatívne nízkej cene v porovnaní s ostatnými typmi. Naopak nevýhodou môže byť obmedzený hmotnostný rozsah, ktorý závisí na kvalite konštrukcie detektora a je ohraničený hodnotou m/z 3000 [108].

Pravdepodobne najvyužívanejším analyzátorom v súčasnej hmotnostnej spektrometrii je *separácia podľa doby letu* (TOF – time of fly). Tento typ separácie iónov je často využívaný i pri biotypizácii mikroorganizmov [79], [89], [109].

Princíp TOF analyzátora spočíva v meraní času potrebného na prelet iónu z ionizačnej komory iónového zdroja k detektoru. Cyklus je vždy zahájený pulzom elektrónového lúča, ktorý generuje diskretný iónový oblak, a ten je urýchlčený v akceleračnej sekcii. Pri zrýchlčení

ióny so zhodným nábojom získavajú rovnakú kinetickú energiu, majú však rozdielne hmotnosti, preto sa budú líšiť ich rýchlosti. Z urýchľovacej časti sú ióny vedené do dlhej (1 m) trubice, v ktorej nie je žiadne pole. V tejto trubici dochádza k separácii iónov podľa ich rozdielných rýchlostí, takže k detektoru, ktorý je umiestnený na konci trubice, prilietajú najskôr ľahšie ióny a až neskôr ťažšie [100]. Avšak i jedna molekula (napr. cytochróm C) môže po ionizácii tvoriť ióny s viacerými nábojmi a aj keď majú všetky takmer totožnú hmotnosť (líšiaca sa o hmotnosť elektrónu/elektrónov), nedopadajú na detektor súčasne. Najskôr dopadajú ióny s najväčším nábojom (majú najväčšiu kinetickú energiu a najmenšie m/z) a najneskôr najmenej nabité ióny (**Obr. 8**).



Obr. 8: Hmotnostné spektrum cytochrómu C.

Okrem vyššie uvedených analyzátorov sa čoraz častejšie využíva *iónová cyklotronová rezonancia* (ICR), ktorou dokážeme veľmi presne stanoviť hmotnosti prítomných iónov. Ďalej sú známe elektrostatické analyzátory, analyzátor s dvojnásobnou fokusáciou, 3D-iónová pasca, lineárna iónová pasca (IT) a orbitrap. Voľba konkrétneho typu analyzátora závisí od cieľa analýzy a od požadovaného rozlíšenia. Hodnoty rozlišovacích schopností (RP) sa pohybujú rádovo $10^3 - 10^6$ (napr. kvadrupól má RP do 5 000, ICR môže mať RP viac ako jeden milión). Nízkorozlišovacie analyzátory sú schopné stanoviť molekulovú hmotnosť s presnosťou na jednotky alebo desatiny, vysokorozlišovacie systémy umožňujú presnosť stanovenia na 3 – 4 desatinné miesta [101], [102], [103].

2.6.3 Detektory v MS

Detektor registruje ióny po prelete analyzátorom a prevádza (a často i zosilňuje) prúd dopadajúcich iónov na prúd elektrónov. Medzi základné typy detektorov patria *násobič sekundárnych elektrónov*, *fotónový násobič* a *Faradayova klietka* [100], [106].

Elektrónový násobič vzhľadom k statickému charakteru zosilnenia primárneho signálu síce poskytuje priemerne o dva poriadky väčšiu odozvu ako Faradayova klietka, presnosť je však nižšia. Tieto detektory majú niekoľko nedostatkov: nemajú uspokojujúcu stabilitu, ich zosilnenie závisí od predchádzajúcich prevádzkových podmienok, ich citlivosť závisí od hmotnosti dopadajúceho iónu, jeho molekulárnej štruktúry a atómovom zložení [100].

Faradayova klietka je vhodným detektorom na presné merania relatívne silných iónových prúdov, ktorých veľkosť sa mení pomaly. Princípom detektora je malá kovová elektróda umiestnená vo Faradayovej klietke (celouzatvorená klietka vytvorená z elektricky vodivého materiálu) tak, že plocha dopadu je sklonená vzhľadom k trajektórii iónov, aby odrážané ióny alebo vyrazené sekundárne elektróny nemohli uniknúť z klietky. Takto meraný a zosilovaný iónový prúd je úmerný počtu nábojov na ión a počtu iónov. Faradayova klietka je na energii, hmotnosti a chemickej štruktúre iónov nezávislý detektor a jeho hmotnostná diskriminácia je v porovnaní s elektrónovým násobičom malá. Výhodou tohto jednoduchého detektoru je aj skutočnosť, že pri bežnom zapojení môžu dosiahnuť kolektor (zbernú elektródu detektoru) len tie ióny, ktorých energia zodpovedá plnej energii dosiahnutej pri akcelerácii. Zmenou potenciálu elektród je možné detekovať len tie ióny s energiou väčšou ako určitá nastavená hodnota [100], [106].

3 CIEĽ PRÁCE

Prvotným cieľom diplomovej práce bolo optimalizovanie metódy a vytvorenie protokolu na čo možno najspoľahlivejšiu, cenovo dostupnú a časovo nenáročnú identifikáciu kvasiniek rodu *Cryptococcus* pomocou MALDI – TOF MS vhodnú pre podmienky Chemického ústavu Slovenskej akadémie vied.

Po výbere optimálnej metódy sme sa zamerali na kvasinky skupiny *Cryptococcus laurentii*. Za cieľ sme si stanovili reklasifikovať jednotlivé kmene zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, pôvodne identifikované ako *Cryptococcus laurentii* (CCY 17-3-číslo) pomocou MALDI – TOF MS. Na priradenie druhu kvasinky k získaným hmotnostným spektrám sa využili výsledky zo sekvenčnej analýzy D1/D2 domén LSU rRNA génu.

Ďalším cieľom bolo vytvorenie databázy (knižnice) hmotnostných spektier, pomocou ktorej by sa identifikácia neznámych čistých kultúr kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* niekoľkonásobne zrýchlila a zefektívnila.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Zoznam použitých kvasiniek

Na biotypizáciu pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI – TOF boli použité kmene kvasiniek rodu *Cryptococcus* (**Tab. 2**) zo Zbierky kultúr kvasiniek (CCY) nachádzajúcej sa na Chemickom ústave Slovenskej akadémie vied v Bratislave.

Tab. 2

CCY	Zbierkový názov	Zdroj
17-1-4	<i>Cryptococcus neoformans</i> *	Hubálek, 1971 → ATCC 346
17-1-5	<i>Cryptococcus neoformans</i> *	Hubálek, 1971
17-1-8	<i>Cryptococcus neoformans</i> *	KH 9-2-1, strain „C“, prof. Kanji Takeo, Japonsko, 2002
17-3-2	<i>Cryptococcus laurentii</i> – Type*	CBS 139, 1965
17-3-5	<i>Cryptococcus laurentii</i> var. <i>laurentii</i>	E. Stadelman, Basel, 1976, list hrušky
17-3-7	<i>Cryptococcus laurentii</i>	jazero Plavecký Štvrtok, 1987
17-3-8	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Jakubov rybník, 1991
17-3-9	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Jakubov rybník, 1991
17-3-10	<i>Cryptococcus laurentii</i>	sedimenty, Jakubov rybník, 1991
17-3-11	<i>Cryptococcus laurentii</i>	sedimenty, Jakubov rybník, 1991
17-3-13	<i>Cryptococcus laurentii</i>	voda Dunaj, máj 1993
17-3-14	<i>Cryptococcus laurentii</i>	voda Dunaj, júl 1993
17-3-15	<i>Cryptococcus laurentii</i> *	voda Malý Dunaj, máj 1993
17-3-16	<i>Cryptococcus laurentii</i>	voda Malý Dunaj, november 1993
17-3-17	<i>Cryptococcus laurentii</i> *	voda Dunaj, marec 1994
17-3-19	<i>Cryptococcus laurentii</i>	voda Morava, december 1994
17-3-20	<i>Cryptococcus laurentii</i>	voda Morava, december 1994
17-3-21	<i>Cryptococcus laurentii</i>	voda Morava, február 1995
17-3-22	<i>Cryptococcus laurentii</i>	zem-les, 1999
17-3-23	<i>Cryptococcus laurentii</i>	zem-les, 1999
17-3-24	<i>Cryptococcus laurentii</i>	zem-les, 1999
17-3-25	<i>Cryptococcus laurentii</i>	zem-tráva, 2000
17-3-27	<i>Cryptococcus laurentii</i>	zem-tráva, 2000
17-3-28	<i>Cryptococcus laurentii</i>	poľnohospodárska pôda, 2002
17-3-29	<i>Cryptococcus laurentii</i> *	poľnohospodárska pôda, 2002
17-3-30	<i>Cryptococcus laurentii</i>	listy zo stromov, 2004
17-3-31	<i>Cryptococcus laurentii</i> *	listy z ovocného stromu, 2004
17-3-32	<i>Cryptococcus laurentii</i>	listy z ovocného stromu, 2004
17-3-33	<i>Cryptococcus laurentii</i>	listy z ovocného stromu, 2004
17-3-34	<i>Cryptococcus laurentii</i>	listy z ovocného stromu, 2004
17-3-35	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Křišťůfek, ČR, 2011
17-3-36	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Křišťůfek, ČR, 2011
17-3-37	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Křišťůfek, ČR, 2011

CCY	Zbierkový názov	Zdroj
17-3-38	<i>Cryptococcus laurentii</i> *	kvety z ovocného stromu, 2013
17-3-39	<i>Cryptococcus laurentii</i>	ovocie, 2013
17-3-22 ₁	<i>Cryptococcus laurentii</i> var. <i>flavescens</i>	nový izolát, kontaminovaná pôda
17-4-39	<i>Cryptococcus magnus</i> *	listy z ovocného stromu, 2007
17-4-40	<i>Cryptococcus magnus</i> *	listy z ovocného stromu, 2007
17-4-41	<i>Cryptococcus magnus</i> *	kvety ovoc. stromu (hruška)

Kmene označené hviezdikou (*) boli použité na vytvorenie vhodného protokolu (metódy) na identifikáciu kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii*.

4.2 Kultivačné médium

Vybrané kvasinky rodu *Cryptococcus* boli kultivované na dvoch médiách. Jedno médium bolo tekuté laktóзовé, druhé médium bol sladinový agar. Obe média boli pred zaočkovaním vysterilizované

Kvasinky skupiny *Cryptococcus laurentii* podrobené biotypizácii boli kultivované na sladinovom agare.

4.2.1 Tekuté laktóзовé médium

Jeden liter tekutého laktóзовého média bol pripravený rozpustením zložiek podľa **Tab. 3**.

Tab. 3

Laktóзовé médium	g · l ⁻¹
laktóza	20
kvasničný autolyzát	5
síran amónny	3
heptahydrát síranu horečnatého	1
dihydrogenfosforečnan draselný	0,5

K takto pripravenému jednému litru média bol pridaný 1 ml roztoku s mikroelementami, ktorý na 100 ml destilovanej vody obsahoval zložky uvedené v **Tab. 4**.

Tab. 4

Mikroelementy laktóзовého média	mg · 100 ml ⁻¹
heptahydrát síranu železnatého	100
síran zinočnatý	65,6
dekahydrát tetraboritanu sodného	35
monohydrát síranu manganatého	10,5
tetrahydrát heptamolybdenanu amonneho	7,2
pentahydrát síranu meďnatého	6

4.2.2 Sladinový agar

Tuhé živné médium na kultiváciu kvasiniek, sladinový agar, bolo pripravené rozpustením 70 g agaru so sladinovým extraktom (Merck Malt Extract Agar) v 1000 ml destilovanej vody. Vysterilizované médium sa nechalo vychladnúť v naklonených sterilných skúmavkách.

4.3 Dĺžka kultivácie

Kultivácia na oboch médiách prebiehala dva, štyri, šesť, osem a desať dní. Na identifikáciu kvasiniek boli použité hmotnostné spektrá získané po štyroch dňoch od inokulácie.

4.4 Odber vzoriek

Odber vzorky bol prispôbený kultivačnému médiu. Z tekutého laktózového média bola vzorka (1 ml suspenzie buniek) odoberaná sterilnou pipetou do čistej mikroskúmavky. Zo sladinového agaru (pevné médium) sa vzorka (kvasinková kolónia) odoberala sterilnou inokulačnou slučkou (tzv. „jedno očko“). Bunky boli premiestnené do čistých mikroskúmaviek a resuspendované v 1 ml destilovanej vody, prípadne 1 ml 75% etanolu.

Na biotypizáciu boli použité len bunky odoberané zo sladinového agaru resuspendované v 1 ml destilovanej vody.

4.5 Premývanie buniek

Po odbere boli bunky v mikroskúmavkách homogenizované minimálne jednu minútu (Vortex). Vzniknutá suspenzia bola centrifugovaná minimálne dve minúty pri 13 000 otáčok/min. Po opatrnom odpipetovaní supernatantu nasledovala extrakcia proteínov, alebo bolo do postupu zaradené premývanie buniek.

Bunky sa premývali destilovanou vodou a to tak, že k sedimentu bol pridaný 1 ml destilovanej vody a po dôkladnej homogenizácii (minimálne jedna minúta) a centrifugácii (minimálne dve minúty pri 13 000 otáčok/min) bol odstránený supernatant. Tento postup premývania sa opakoval dva, päť, sedem alebo desaťkrát, alebo sa premývalo len raz destilovanou vodou a druhýkrát sa premývalo 75% etanolom.

Biotypizované kvasinky boli pred extrakciou premývané sedemkrát.

4.6 Extrakcia proteínov

Intracelulárne proteíny sa extrahovali z buniek viacerými spôsobmi:

1. *Extrakcia kyselinou mravčou po dobu 5 min:* k sedimentu v mikroskúmavke bolo pridaných 50 µl 70% roztoku kyseliny mravčej (Merck) a extrakcia sa nechala prebiehať počas piatich minút. Následne bolo do mikroskúmavky pridaných 50 µl 100% acetonitrilu (Merck) a suspenzia bola homogenizovaná a vzniknutá suspenzia bola centrifugovaná 2 minúty pri 13 000 otáčkach/min.
2. *Extrakcia kyselinou mravčou po dobu 30 min:* rovnaký postup ako v predchádzajúcom prípade s tým rozdielom, že extrakcia prebiehala 30 minút.
3. *Extrakcia roztokom MALDI matric:* k sedimentu v mikroskúmavke bolo pridaných 50 µl roztoku MALDI matric. Opäť boli zvolené dve doby extrakcie, 5 resp. 30 minút. Použité boli viaceré kombinácie koncentrácií kyseliny trans-ferulovej (FA), kyseliny sinapovej (SA) rozpustených v acetonitrile (ACN) s obsahom kyseliny trifluór-octovej (TFA). Presné zloženie matric je uvedené v kapitole 4.7.2.

Proteíny kvasiniek podrobených biotypizácii boli extrahované 30 minút roztokom MALDI matrice. Bol použitý aj druhý spôsob extrakcie proteínov uskutočnený podľa podľa Bruker protokolu pre obtiažné prípady [97].

4.7 Použité MALDI matrice

V rámci optimalizovania metodiky bolo použitých viacero typov matric. Základné typy sú dva, ostatné sa líšia len v koncentráciách jednotlivých zložiek. Na biotypizáciu kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* bola použitá zmesná matrica s 2,5% kyselinou trifluóroctovou (kapitola 4.7.2.1) ako aj kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová (kapitola 4.7.1).

4.7.1 Kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová (CHCA)

Prvý základný typ matrice použitej na MALDI – TOF analýzu bola kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová (CHCA) o koncentrácii 10 mg/ml.

Na prípravu 1 ml matrice bolo rozpustených 10 mg CHCA v roztoku zloženom z 500 μ l 5% kyseliny trifluóroctovej (TFA) a v 500 μ l 100% acetonitrilu (ACN).

Použitá kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová (SIGMA – ALDRICH) mala čistotu $\geq 99,0$, ostatné použité chemikálie boli PA kvality (MERCK).

Tento typ matrice bol použitý na biotypizáciu všetkých testovaných kvasiniek.

4.7.2 Zmesná MALDI matrica

Táto matrica slúžila aj ako extrakčné činidlo (vid'. kapitola 4.6). Bola pripravená zmiešaním dvoch roztokov kyselín v pomere 1:1. Prvý roztok obsahoval kyselinu trans-ferulovú rozpustenú v zmesi ACN a TFA v pomere 7:3. Druhý roztok obsahoval kyselinu sinapovú rozpustenú tiež v zmesi ACN a TFA v pomere 7:3. Výsledné koncentrácie oboch kyselín boli po zmiešaní roztokov polovičné.

Boli použité rôzne typy tejto zmesnej matrice. Postup prípravy bol rovnaký, rozdiel bol v koncentráciách použitých kyselín, ACN a TFA. Uvedené koncentrácie kyselín, ACN a TFA sú počiatočné. Na prípravu prvého typu bola použitá 2,5% TFA, na prípravu druhého typu 10% TFA.

Použitá kyselina trans-ferulová (SIGMA – ALDRICH) mala čistotu $\geq 99,0$. Kyselina sinapová (SIGMA – ALDRICH) mala čistotu $\geq 99,0$. Ostatné použité chemikálie boli PA kvality (MERCK).

Na biotypizáciu sa používala zmesná matrica s 2,5% TFA ($SA_{10\text{ mg/ml}}:FA_{30\text{ mg/ml}}=1:1$; 100% ACN: 2,5% TFA = 7:3). Návod na prípravu tejto matrice je uvedený v kapitole 4.7.2.1, pričom boli použité nižšie koncentrácie oboch kyselín (10 mg/ml a 30 mg/ml) a bezvodý ACN.

4.7.2.1 Zmesná MALDI matrica s 2,5% TFA

Na prípravu 2 ml tejto matrice bolo do jednej mikroskúmavky navážených 10 alebo 20 mg kyseliny trans-ferulovej a do druhej mikroskúmavky bolo navážených 30 alebo 60 mg kyseliny sinapovej. Obe navážky boli rozpustené v 700 μ l 100% alebo 70% ACN a 300 μ l 2,5% TFA. Vzniknuté roztoky boli zmiešané v pomere 1:1. Na lepšiu homogenizáciu bol použitý ultrazvuk.

4.7.2.2 Zmesná MALDI matrica s 10% TFA

Na prípravu 2 ml tejto matrice bolo do jednej mikroskúmavky navážených 10 alebo 20 mg kyseliny trans-ferulovej (FA) a do druhej mikroskúmavky bolo navážených 30 alebo 60 mg kyseliny sinapovej (SA). Obe navážky boli rozpustené v 700 μ l 100% alebo 70% ACN a 300 μ l 10% TFA. Vzniknuté roztoky boli zmiešané v pomere 1:1. Na lepšiu homogenizáciu bol použitý ultrazvuk.

4.8 Nanášanie vzorky na MALDI platňu

Ak bola použitá extrakcia roztokom matrice (viď. kapitola 4.6), na jeden spot MALDI platne (MTP 384 target plate polished steel T F, Bruker) bol napipetovaný 1 μ l supernatantu, ktorý sa nechal vysušiť.

V prípade extrakcie proteínov kyselinou mravčou (viď. kapitola 4.6) boli použité tri spôsoby nanášania vzorky na MALDI platňu.

Prvý spôsob: 1 μ l supernatantu (vzorky) bol napipetovaný na platňu a po vysušení bol prevrstvený 1 μ l matrice.

Druhý spôsob: na platňu bola napipetovaná najprv matrica (0,5 μ l), po vysušení bola pridaná vzorka (0,5 μ l), ktorá sa nechala voľne vysušiť a nakoniec bola opäť pridaná matrica (0,5 μ l). Takto pripravený analyt sa nechal za laboratórnych podmienok vykryštalizovať.

Tretí spôsob: vzorka (0,5 μ l) bola okamžite po nanesení na platňu premiešaná s 0,5 μ l matrice.

Pri biotypizácii sa používal prvý spôsob nanášania vzorky a matrice na MALDI platňu.

4.9 Hmotnostná spektrometria

Všetky merania boli uskutočnené v pozitívnom lineárnom móde na zariadení Bruker UltrafleXtreme. Toto zariadenie má typ laseru Smartbeam – IITM (Bruker), ktorý emituje žiarenie o vlnovej dĺžke 355 nm. Používala sa frekvencia laseru 1 000 Hz (maximálna frekvencia laseru je 2 000 Hz). Urýchlovač mal napätie 25 kV. Meranie sa robilo v rozsahu od 2 000 do 22 000 Da a počet výstrelů bol 1 000 na vzorku. Zariadenie bolo kalibrované na cytochróm C (SIGMA – ALDRICH). Merania boli riadené programom flexControl v. 3.4 (Bruker Daltonik GmbH).

4.9.1 Softvér na vyhodnocovanie hmotnostných spektier

Namerané hmotnostné spektrá boli vyhodnocované a porovnávané v dvoch programoch. Všetky spektrá boli vizuálne porovnané v programe mMass - Open Source Mass Spectrometry Tool. Na základe porovnania hlavných píků (píků s vysokou intenzitou) boli roztriedené do skupín. Hmotnostné spektrá boli navzájom porovnané aj v programe MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH). V tomto programe bolo vypočítané aj porovnávacie skóre. Na zobrazenie sa výsledkov sa využili spektrá spracované týmto programom.

4.10 Sekvenčná analýza D1/D2 domén LSU rRNA génu

Sekvenčná analýza D1/D2 domén LSU rRNA génu (skrátene D1/D2 LSU rRNA sekvenácia) kvasiniek rodu *Cryptococcus* bola uskutočnená pracovníkmi Zbierky kultúr kvasiniek (CCY) podľa príslušného manuálu (Kurtzman, 1997) [112].

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Optimalizácia metódy prípravy vzorky na analýzu hmotnostnou spektrometriou

Pracovný postup prípravy vzoriek na MALDI – TOF hmotnostnú spektrometriu bol optimalizovaný na kmeňoch druhu *Cryptococcus magnus* (CCY 17-4-39, CCY 17-40, CCY 17-4-41), *Cryptococcus neoformans* (CCY 17-1-4, CCY 17-1-5, CCY 17-1-8) a náhodne vybraných kmeňoch skupiny *Cryptococcus laurentii* (CCY 17-3-2, CCY 17-3-15, CCY 17-3-17, CCY 17-3-29, CCY 17-3-31, CCY 17-3-38) zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV.

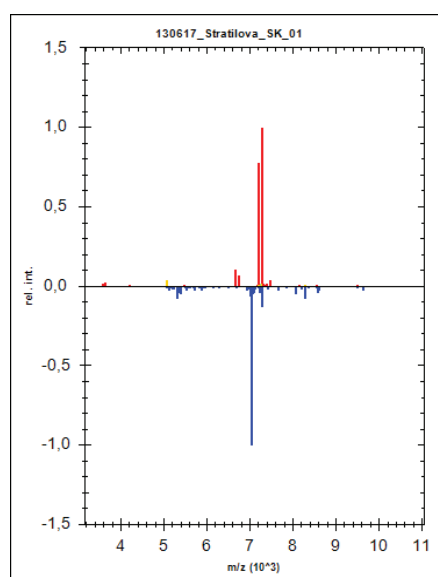
Pri optimalizácii metódy sa vychádzalo z overeného postupu prípravy vzoriek intaktných spór plesní (ISMS) pre hmotnostnú spektrometriu, kedy sa ako MALDI matrica použila zmes kyseliny sinapovej a kyseliny ferulovej rozpustených v zmesi ACN a TFA [75] a z postupu na biotypizáciu mikroorganizmov podľa Bruker protokolu na základe MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2 pre obtiažné prípady [97].

Testoval sa predpoklad vplyvu kultivačného média na výsledné hmotnostné spektrá, volila sa optimálna dĺžka kultivácie a extrakčná metóda. Optimalizovalo sa zloženie roztoku MALDI matric, nanášanie vzorky a matrice na MALDI platňu a hodnotil sa aj počet purifikačných krokov (premývanie destilovanou vodou a etanolom).

5.1.1 Vplyv kultivačného média

Na testovanie vplyvu kultivačného média na získané hmotnostné spektrá sa kvasinky kultivovali na dvoch kultivačných médiách. Jedno bolo tekuté laktóзовé médium, druhé bol sladínový agar.

V programe MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH) boli získané normalizované spektrá. Z ich vzájomného porovnania vyplýva, že skutočne záleží na akom médiu bol mikroorganizmus kultivovaný, pretože získané spektrá boli tak odlišné, akoby sa jednalo o iný mikroorganizmus. Napr. skóre pre CCY 17-3-29 rastúce na týchto dvoch médiách (**Obr. 9**) je len 0,121, pričom v prípade zhody by malo mať skóre hodnotu $\geq 2,0$.



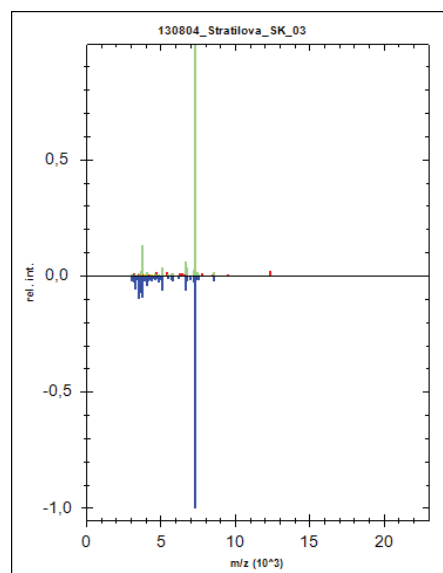
Obr. 9: Vplyv kultivačného média (sladínový agar a tekuté laktóзовé médium) na MS spektrum mikroorganizmu CCY 17-3-29 (skóre 0,121).

Zbierka kultúr kvasiniek (CCY) ako médium najčastejšie používa sladínový agar a keďže jeden z cieľov bolo vytvorenie databázy hmotnostných spektier určenej na rýchlu identifikáciu kvasiniek pre túto zbierku mikroorganizmov, všetky kmene skupiny *Cryptococcus laurentii* podrobené identifikácii (**Tab. 2**) boli kultivované práve na sladínovom agare.

5.1.2 Voľba doby kultivácie

Všetky testované kmene boli po preočkovaní na sterilné živné médium kultivované desať dní. Odbery sa robili každý druhý deň (2., 4., 6., 8. a 10. deň). U pomalšie rastúcich kmeňov nebol odber po 48 hodinách realizovaný. Vzájomným porovnaním získaných hmotnostných spektier v jednotlivých dňoch u konkrétneho kmeňa sme dospeli k záveru, že doba kultivácie 4 – 6 dní nemá zásadný vplyv na výsledné hmotnostné spektrum (**Obr. 10**). Hmotnostné spektrá získané z odberov v 8. a 10. deň boli viac poznačené šumom a okrem hlavných pík (s vysokou intenzitou signálu) typických pre daný kmeň, obsahovali aj množstvo pík s malou intenzitou signálu, ktoré mali za následok zníženie hodnoty skóre pri porovnávaní hmotnostných spektier programom MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH).

Keďže rozdiel v hmotnostných spektrách získaných zo 4. resp. 6. dňa bol minimálny a po dvoch dňoch niektoré kmene dostatočne nenarástli, bola optimálna doba kultivácie stanovená na 4 dni.



Obr. 10: Porovnanie spektier zo 4. a 6. dňa kultivácie CCY 17-3-31 (skóre 2,125).

5.1.3 Vplyv premývania buniek na získané hmotnostné spektrá

Keďže kvasinky rodu *Cryptococcus* sú prevažne kapsulárne a navyše produkujú veľké množstvo extracelulárnych polysacharidov, skúmal sa aj vplyv premývania buniek na kvalitu spektier získaných MALDI – TOF MS. Testoval sa efekt počtu opakovaní (dva, päť, sedem a desať opakovaní) premývania destilovanou vodou (1 ml) a testovalo sa aj jednonásobné premytie 75% roztokom etanolu (1 ml) s následným premytím destilovanou vodou (1 ml) [97]. Výsledné hmotnostné spektrá boli vizuálne vyhodnotené v programe mMass - Open Source Mass Spectrometry Tool.

So stúpajúcim počtom premývaní síce narastal čas potrebný na analýzu vzoriek, ale hmotnostné spektrá sa stávali prehľadnejšími, t.j. postupne sa znižoval počet pík s menšou intenzitou signálu, až nakoniec ostali len píky s vysokou intenzitou, ktoré boli typické pre daný kmeň (resp. skupinu kmeňov). Premývaním buniek sa pravdepodobne postupne

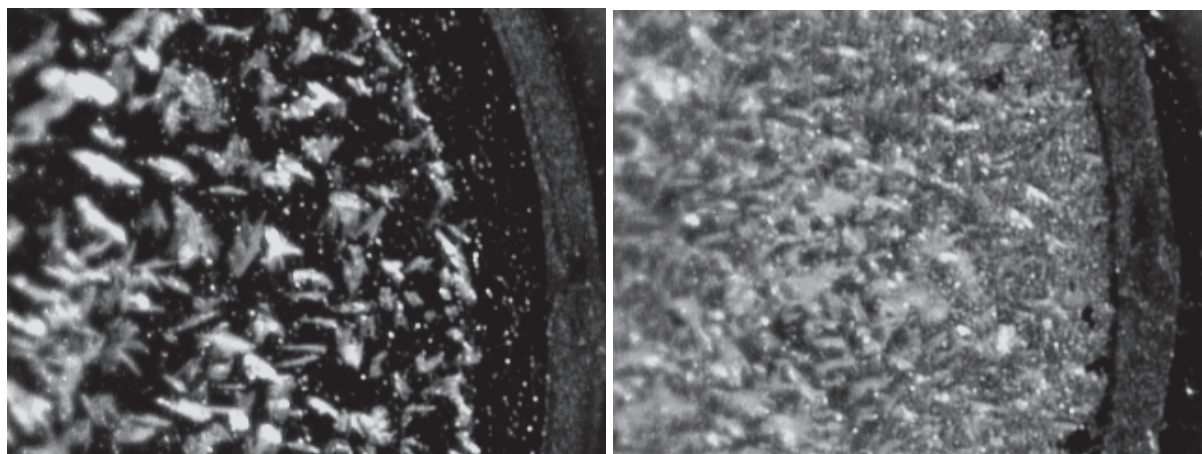
z bunkovej suspenzie odstraňovali vo vode rozpustné nečistoty a zároveň časť extracelulárnych polysacharidov.

Rozdiel medzi sedem násobným a desať násobným premývaním nebol tak zreteľný, ako v ostatných prípadoch. Zvolili sme kompromis medzi počtom opakovaní, cenou a časom analýzy a optimálny počet premývaní sme stanovili na sedemkrát. Tento postup sme porovnali s doporučeným premývaním 75% etanolom s následným premytím destilovanou vodou [97], ale táto kombinácia sa ukázala ako nedostatočná.

5.1.4 Vplyv doby extrakcie, koncentrácie extrakčného činidla a rozpúšťadiel

V procese optimalizácie metódy sa skúmali dva extrakčné spôsoby. Proteíny sa extrahovali zmesou SA, FA a TFA, ktoré boli priamo zložkou roztoku MALDI matric, alebo bola na extrakciu použitá 70% kyselina mravčia. V oboch prípadoch extrakcia prebiehala buď 5 minút alebo 30 minút.

Päťminútová extrakcia je síce časovo výhodná, ale získané MALDI hmotnostné spektrá neboli tak charakteristické ako v prípade tridsaťminútovej extrakcie. Dĺžka extrakcie mala vplyv i na kryštalizáciu vzoriek. Na **Obr. 11** sú zobrazené mikroskopické fotografie vzoriek pripravených za rovnakých podmienok s rozdielnou dĺžkou extrakcie. Už na prvý pohľad je medzi kryštálmi markantný rozdiel, ktorý sa prejavil aj vo vygenerovaných hmotnostných spektrách. Doba extrakcie bola preto stanovená na 30 min.



Obr. 11: Mikroskopické obrázky vykryštalizovanej vzorky (kvasinka CCY 17-3-29 kultivovaná 4 dni na sladínovom agare, bunky po sedem násobnom premytí destilovanou vodou) extrahovanej MALDI matricou (SA:FA = 1:1; ACN: 2,5% TFA = 7:3), vľavo 5 minút, vpravo 30 minút. Fotografie boli zhotovené pomocou kamery zabudovanej v hmotnostnom spektrometri.

Sledoval sa i vplyv koncentrácie TFA v roztoku MALDI matrice. Na extrakciu boli použité dve matrice, každá s rozdielnym obsahom TFA. Na prípravu prvej matrice (SA:FA = 1:1; ACN:TFA = 7:3) bola použitá 2,5% TFA, jej výsledná koncentrácia bola 0,75 % v/v. Na prípravu druhej matrice (SA:FA = 1:1; ACN:TFA = 7:3) bol použitý štyrikrát koncentrovanejší roztok TFA (=10 % v/v). Výsledná koncentrácia TFA v roztoku s matricou bola 0,3 % v/v.

Rozdiel medzi extrakciou pomocou 0,75% TFA a 3% TFA nebol zistený, t.j. vplyv koncentrácie TFA na permeabilizáciu bunkovej steny nebol pozorovaný a proteínové profily

boli v oboch prípadoch takmer identické. V rámci šetrenia chemikálií (financií) bola v nasledujúcich experimentoch použitá nižšia koncentrácia TFA.

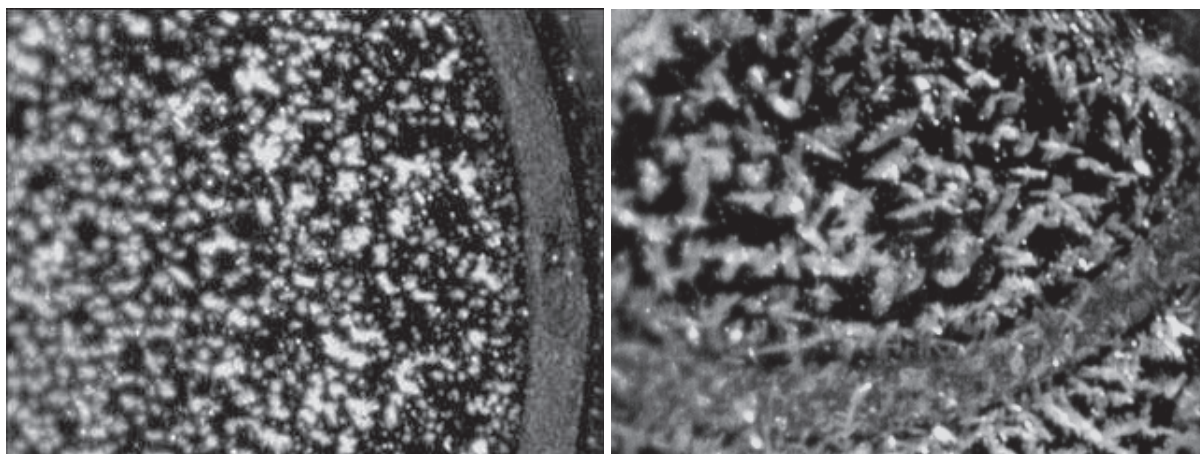
Tak isto sa sledoval vplyv koncentrácie ACN, SA a FA. Ako optimálna bola zvolená 100% počiatočná koncentrácia ACN. Optimálna počiatočná koncentrácia SA bola zvolená na 30 mg/ml a optimálna počiatočná koncentrácia FA bola zvolená na 10 mg/ml.

5.1.5 Rozdiely vplyvu použitých MALDI matric

Celkovo sa testovali tri matrice, dve zmesné s rozdielnym obsahom SA a FA (SA:FA = 60 mg/ml:20 mg/ml a SA:FA = 30 mg/ml:10 mg/ml), ktoré slúžili aj ako extrakčné činidlá a tretia matrica bola CHCA.

Zmesná matrica s vyššou koncentráciou SA a FA nebola v ďalších experimentoch použitá, lebo vyššia koncentrácia ako aj nižšia koncentrácia oboch kyselín viedli k identickým spektrám. Preto sa ďalej v práci používajú len dve MALDI matice, a to zmesná matrica so složením SA:FA = 30 mg/ml:10 mg/ml; 100% ACN:2,5% TFA = 7:3 a CHCA (10 mg/ml). Uvedené koncentrácie všetkých chemikálií sú počiatočné.

Vplyv matrice na kryštalizáciu vzoriek je zreteľný (*Obr. 12*). Vzorky pripravené rovnakým postupom s rozdielnou MALDI matricou tvoria odlišné kryštály, čo sa prejavuje i v rozdielnych hmotnostných spektrách.



Obr. 12: Mikroskopické obrázky vykryštalizovanej vzorky (kvasinka CCY 17-3-29 kultivovaná 4 dni na sladinovom agare, bunky po premytí 75% roztokom etanolu a jednonásobnom premytí destilovanou vodou a 30 minútovej extrakcii 70% kyselinou mravčou) s rozdielnymi MALDI matricami; vľavo s CHCA, vpravo s SA:FA = 1:1; ACN: 2,5% TFA = 7:3. Fotografie boli zhotovené pomocou kamery zabudovanej v hmotnostnom spektrometri.

5.1.6 Nanášanie vzoriek na MALDI platňu

Zo všetkých troch testovaných spôsobov nanášania vzoriek na MALDI platňu v prípade extrakcie kyselinou mravčou (kapitola 4.8) sa ako najoptimálnejší javil spôsob nanesenia 1 μ l vzorky, ktoré bola po vysušení prevrstvená MALDI matricou (1 μ l) a takto pripravený analyt sa opätovne nechal vysušiť za laboratórnych podmienok.

5.1.7 Návrh optimalizovanej metódy pre biotypizáciu kvasiniek rodu *Cryptococcus*

Za najoptimálnejší postup spracovania vzoriek kvasiniek rodu *Cryptococcus* považujeme odber kolónií v štvrtý deň, ich 7násobné premytie destilovanou vodou, extrakciu proteínov z buniek zmesnou matricou (SA:FA = 30 mg/ml:10 mg/ml; 100% ACN:2,5% TFA = 7:3), po

30 minútach a následnej centrifugácii napipetovanie 1 μ l supernatantu na MALDI platňu. Podrobnejšie je tento pracovný postup rozpísaný v kapitole 5.1.7.1.

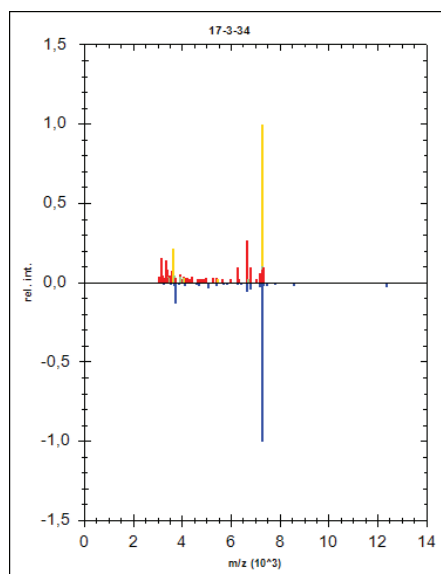
5.1.7.1 Optimalizovaný pracovný postup použitý na biotypizáciu kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii*

Postup sa skladá z nasledujúcich krokov:

1. Napipetuj 1 ml destilovanej vody do čistej mikroskúmavky.
2. Sterilne premiestni jednu kolóniu biologického materiálu do skúmavky.
3. Homogenizuj minimálne jednu minútu.
4. Centrifuguj 2 minúty pri 13 000 otáčok/min.
5. Supernatant opatrne odpipetuj.
6. K sedimentu napipetuj 1 ml destilovanej vody.
7. Opakuj kroky 3, 4, 5 a 6 7krát.
8. K sedimentu napipetuj 50 μ l MALDI matrice (SA:FA = 30 mg/ml:10 mg/ml; 100% ACN:2,5% TFA = 7:3).
9. Extrahuj 30 minút.
10. Centrifuguj 2 minúty pri 13 000 otáčok/min.
11. Na vyčistenú MALDI dosku napipetuj 1 μ l supernatantu a nechaj vysušiť

5.1.7.2 Porovnanie postupu podľa Bruker protokolu pre obtiažne prípady s optimalizovaným postupom

Jeden z postupov, ktorý sa testoval v procese optimalizácie metódy, bol postup prevzatý z MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2 pre obtiažne prípady [97]. Prevzatý postup je uvedený v prílohe (kapitola 8.1). Hmotnostné spektrá vzoriek spracovaných týmto spôsobom boli v programe MALDI Biotyper (Bruker) porovnané s hmotnostnými spektrami získanými postupom, ktorý považujeme za najoptimálnejší (**Obr. 13**).



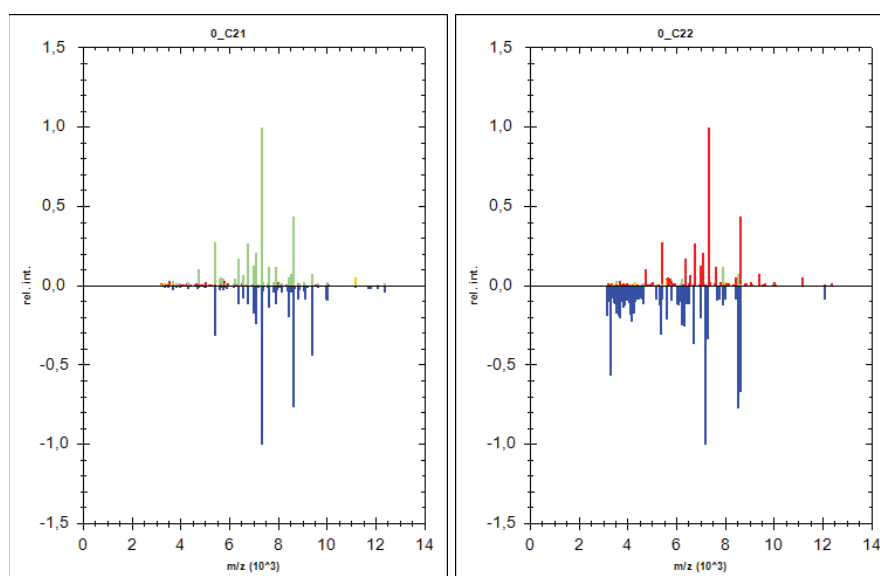
Obr. 13: Porovnanie hmotnostných spektrí proteínového profilu kvasinky CCY 17-3-34 získaných dvomi odlišnými postupmi. Nad osou x je MS spektrum získané postupom podľa Bruker protokolu pre obtiažne prípady [97]. Pod osou x je zobrazené MS spektrum získané postupom, ktorý považujeme za najoptimálnejší.

Hoci postup podľa Bruker protokolu poskytuje bohatšie hmotnostné spektrum s vyššou intenzitou píkovo ako nami navrhnutý postup (**Obr. 13**), reprodukovateľné výsledky dosahuje len v 20 % všetkých prípadoch. Zo všeobecného hľadiska je preto vhodnejší nami navrhnutý postup, ktorý poskytuje uspokojivé spektrá v 100 % všetkých prípadoch.

5.1.7.3 Overenie optimalizovaného postupu identifikáciou kvasiniek *Cryptococcus neoformans*

Optimalizovaným spôsobom (kapitola 5.1.7.1) boli spracované vzorky troch kmeňov zaradených do Zbiekry kultúr kvasiniek ako *Cryptococcus neoformans* (CCY 17-1-4, CCY 17-1-5, CCY 17-1-8). Porovnaním ich normalizovaných spektier (**Obr. 14**) v programe MALDI Biotyper (Bruker), môžeme jednoznačne prehlásiť, že kmeň CCY 17-1-4 je prakticky totožný s kmeňom CCY 17-1-5 (skóre 2,653) a kmeň CCY 17-1-8 sa od zvyšných dvoch kmeňov viac líši ako sa na ne podobá (skóre len 1,172) čo dokumentujú červené píky na **Obr. 14** v pravej časti. Tieto jednoduché, možno až laické tvrdenia, boli potvrdené výsledkami molekulárnej biológie, pomocou D1/D2 LSU rRNA sekvenácie. Analýzou časti genómu bolo zistené, že kmene CCY 17-1-4 a CCY 17-1-5 sú *Cr. neoformans* var. *neoformans* a kmeň CCY 17-1-8 je *Cr. neoformans* var. *grubii*.

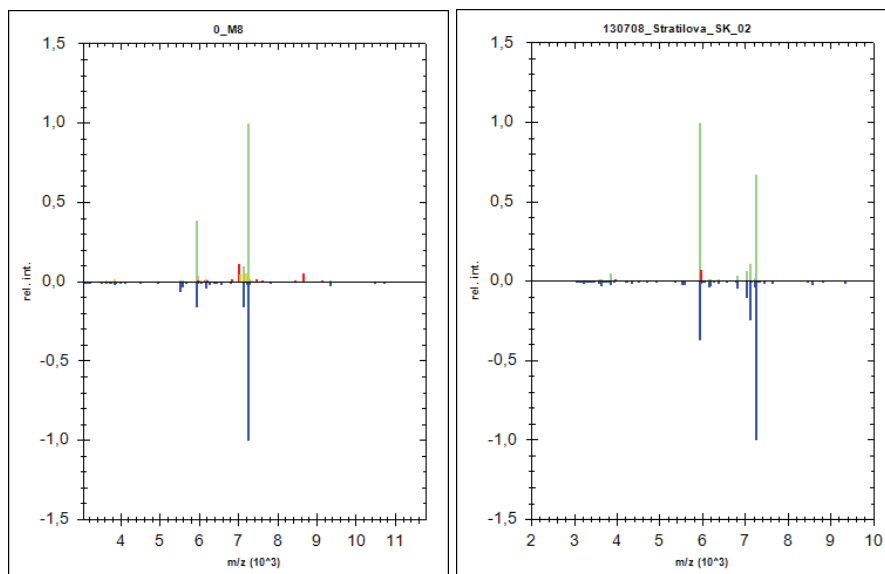
Týmto bolo potvrdené, že výsledný postup, ku ktorému sme dospeli v procese optimalizovania, je vhodný na identifikáciu kvasiniek rodu *Cryptococcus*, a to nielen na úrovni druhu, ale i variety.



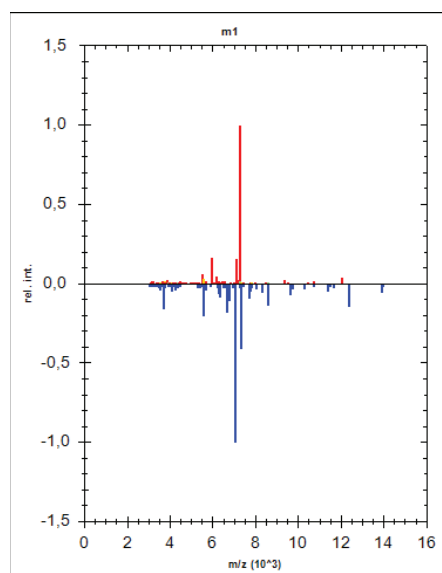
Obr. 14: Porovnanie hmotnostných spektier troch kmeňov *Cr. neoformans*; vľavo - CCY 17-1-4 a CCY 17-1-5 (skóre 2,653); vpravo - CCY 17-1-4 a CCY 17-1-8 (skóre 1,172).

5.1.7.4 Overenie optimalizovaného postupu identifikáciou kvasiniek *Cryptococcus magnus*

Optimalizovaným spôsobom (kapitola 5.1.7.1) boli spracované aj vzorky troch kmeňov zaradených ako *Cryptococcus magnus* (CCY 17-4-39, CCY 17-4-40 a CCY 17-4-41). Kmene CCY 17-4-39 a CCY 17-4-41 boli sekvenované, kmeň CCY 17-4-40 bol zaradený len na základe jeho morfológických a biochemických vlastností. Normalizované hmotnostné spektrá všetkých troch kmeňov vykazovali vzájomnú podobnosť (**Obr. 15**) a zároveň sa výrazne líšili od hmotnostných spektier iných testovaných kmeňov (napr. od typového *Cryptococcus laurentii* CCY 17-3-2 skóre 0,145, **Obr. 16**).



Obr. 15: Porovnanie MS spektra CCY 17-4-39 vľavo s CCY 17-3-41 (skóre 2,070), vpravo s CCY 17-4-40 (skóre 2,053).



Obr. 16: Porovnanie MS spektra CCY 17-4-39 s *Cr. laurentii* CCY 17-3-2 (skóre 0,145).

Týmto sa opäť potvrdilo, že optimalizovaný postup je vhodný na biotypizáciu kvasiniek rodu *Cryptococcus*.

5.2 Biotypizácia kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii*

Biotypizácii bolo podrobených tridsaťtri kmeňov zo Zbierky kultúr kvasiniek (CCY) pôvodne považovaných za kmene *Cryptococcus laurentii*. Na biotypizáciu bola použitá optimalizovaná metóda, výsledky ktorej sa porovnávali s výsledkami získanými podľa doporučeného protokolu [97]. Získané hmotnostné spektrá boli navzájom porovnávané v programe MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH) a manuálne v programe mMass - Open Source Mass Spectrometry Tool. Podľa hodnoty skóre a podobnosti hlavných píkov s vysokou intenzitou boli tieto hmotnostné spektrá rozdelené do šiestich skupín. Identifikácia kvasiniek v jednotlivých skupinách bola možná až na základe výsledkov D1/D2 LSU rRNA sekvenčnej analýzy, ktorá bola realizovaná minimálne pre jeden kmeň v danej skupine. Do

budúcnosti CCY plánuje postupne vykonať sekvenčnú analýzu D1/D2 domén LSU rRNA génu všetkých zbierkových kmeňov.

5.2.1 Skupina I

Do tejto skupiny bol zaradený typový kmeň *Cryptococcus laurentii* CCY 17-3-2. Spektrum tohto kmeňa bolo zvolené ako referenčné pre všetky porovnania.

5.2.2 Skupina II

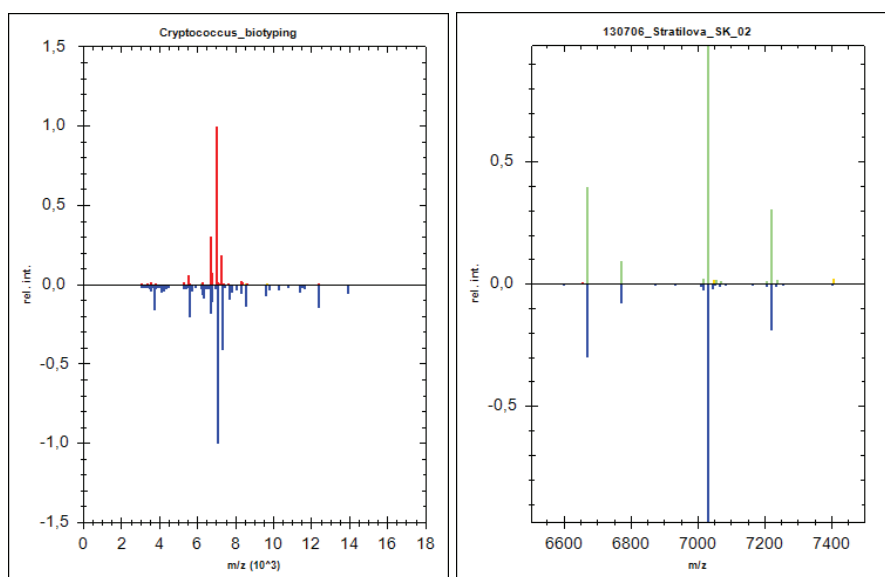
Do tejto skupiny bolo zaradených štrnásť biotypizovaných kmeňov (**Tab. 5**), ktorých hmotnostné spektrá vykazovali vzájomnú podobnosť a pritom sa výrazne líšili od hmotnostných spektier kmeňov zaradených do iných skupín. Táto skupina vykazovala s typovým kmeňom *Cryptococcus laurentii* skóre len okolo 0,8. Ako je vidieť z **Obr. 17 vľavo**, hmotnostné spektrum typového kmeňa *Cryptococcus laurentii* (CCY 17-3-2), u ktorého bola robená aj D1/D2 LSU rRNA sekvenácia, bolo porovnané s hmotnostným spektrom kmeňa 17-3-17, ktorý je podľa D1/D2 LSU rRNA sekvenácie identický s typovým kmeňom. Vzhľadom na nízke skóre sa pravdepodobne oba kmene líšia v inej časti genómu, z čoho usudzujeme, že by sa pravdepodobne mohlo jednať o iné variety, ktoré neboli doposiaľ popísané. Odlišnosť v hmotnostných spektrách môže byť spôsobená aj izoláciou v rozdielnych geografických oblastiach. Kmeň CCY 17-3-2 (CBS 139) bol izolovaný z palmového vína v Kongu a CCY 17-3-17 z vody Dunaja na Slovensku. Sekvenácia ďalších oblastí by mohla priniesť objasnenie tejto odlišnosti.

Ostatné kmene patriace do tejto skupiny vykazujú značnú podobnosť s CCY 17-3-17, ale s CCY 17-3-2 majú skóre približne rovnaké aké mal kmeň 17-3-17 (približne 0,8). Desať kmeňov má s CCY 17-3-17 hodnotu skóre > 2,0, napr. kmeň CCY 17-3-25 má s CCY 17-3-17 hodnotu skóre 2,670 (**Obr. 17 vpravo**). Zvyšných päť kmeňov má hodnotu skóre >1,7. Podľa Mc Taggart je však i hodnota skóre > 1,7 uspokojivá, ak porovnáваме hmotnostné spektrá kvasiniek rodu *Cryptococcus*. Kvôli extrémne rozdielnym hodnotám skóre medzi typovým *Cryptococcus laurentii* (CCY 17-3-2) a CCY 17-3-17 navrhujeme, aby hmotnostné spektrá nových (neznámych) izolátov boli porovnané s typovým kmeňom ako aj s CCY 17-3-17. Porovnania hmotnostných spektier všetkých kmeňov tejto skupiny (i s hodnotou skóre) s hmotnostným spektrom CCY 17-3-17 sú uvedené v prílohe (kapitola **8.2.1**).

Kmene tejto skupiny, u ktorých bola vykonaná D1/D2 LSU rRNA sekvenčná analýza (**Tab. 5**) vykazujú druhovú zhodu s typovým *Cryptococcus laurentii* (CCY 17-3-2) aj s CCY 17-3-17.

Tab. 5: Kmene patriace do Skupiny II

CCY	Robená D1/D2 LSU rRNA sekvenácia	CCY	Robená D1/D2 LSU rRNA sekvenácia
17-3-7	NIE	17-3-20	NIE
17-3-8	NIE	17-3-21	NIE
17-3-9	ÁNO	17-3-22	NIE
17-3-10	NIE	17-3-23	NIE
17-3-11	NIE	17-3-24	ÁNO
17-3-14	NIE	17-3-25	NIE
17-3-17	ÁNO	17-3-27	NIE



Obr. 17: Vľavo porovnanie MS spektra typového *Cryptococcus laurentii* (CCY 17-3-2) s kmeňom CCY 17-3-17 (skóre 0,827). Vpravo porovnanie MS spektier dvoch kmeňov zaradených do skupiny II, CCY 17-3-17 a CCY 17-3-25 (skóre 2,670).

5.2.3 Skupina III:

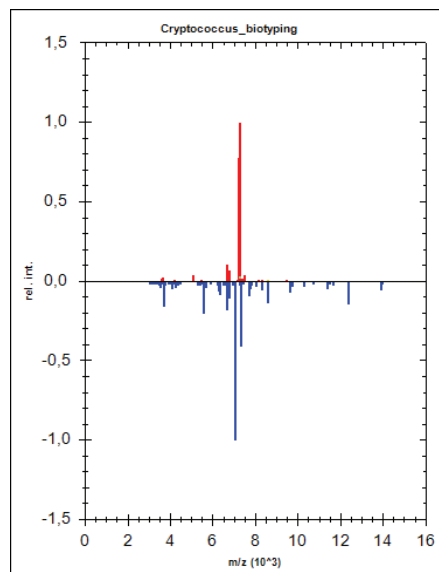
Za referenčný kmeň tejto skupiny bol zvolený CCY 17-3-29. U tohto kmeňa sekvenčná analýza D1/D2 domén LSU rRNA génu potvrdila, že sa nejedná o *Cryptococcus laurentii*, za ktorý bol pôvodne považovaný, ale o *Cryptococcus flavescens*. Všetky biotypizované kmene s podobnými hmotnostnými spektrami ako 17-3-29 (

Tab.6) preto považujeme za *Cryptococcus flavescens*. Vo viac ako 2/3 prípadov (9 kmeňov) bola príslušnosť ku *Cryptococcus flavescens* potvrdená aj D1/D2 LSU rRNA sekvenáciou.

Hodnoty skóre kmeňov tejto skupiny sa výrazne líšili od hodnôt skóre všetkých ostatných skupín. Napríklad pri porovnaní spektra CCY 17-3-2 s hmotnostným spektrom CCY 17-3-29 bola hodnota skóre len 0,606 (**Obr. 18**).

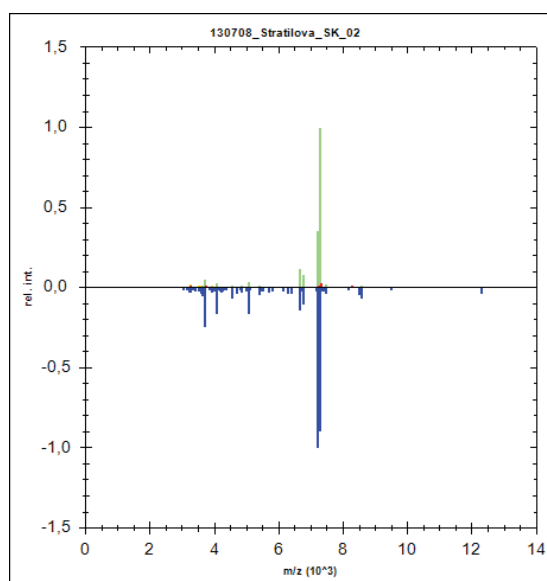
Tab.6: Kmene patriace do Skupiny III

CCY	Robená D1/D2LSUrRNAsekvenácia
17-3-15	ÁNO
17-3-16	NIE
17-3-19	NIE
17-3-28	NIE
17-3-29	ÁNO
17-3-30	NIE
17-3-31	ÁNO
17-3-32	ÁNO
17-3-33	ÁNO
17-3-34	ÁNO
17-3-38	ÁNO
17-3-39	ÁNO
17-3-22 ₁	ÁNO



Obr. 18: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-29 s CCY 17-3-2 (skóre 0,606).

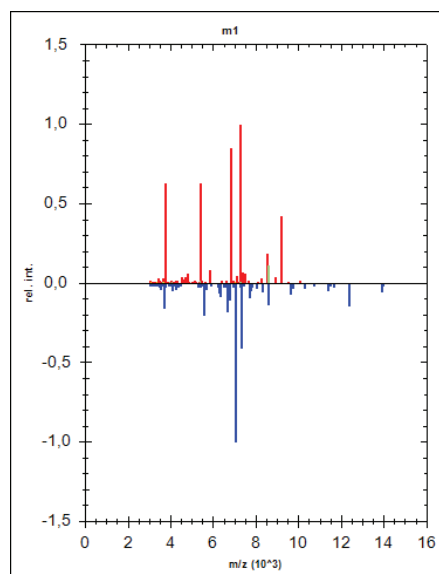
Pri vzájomnom porovnaní hmotnostných spektier v rámci tejto skupiny s CCY 17-3-29 boli hodnoty skóre vo všetkých prípadoch $> 1,9$ a v deviatich prípadoch dokonca $> 2,0$. Napr. pri porovnaní hmotnostných spektier CCY 17-3-29 s CCY 17-3-32 bola hodnota skóre 2,314 (**Obr. 19**). Všetky zvyšné porovnania hmotnostných spektier v rámci tejto skupiny (i s hodnotou skóre) s hmotnostným spektrom CCY 17-3-29 sú uvedené v prílohe (kapitola 8.2.2).



Obr. 19: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-29 s CCY 17-3-32 (skóre 2,314).

5.2.4 Skupina IV

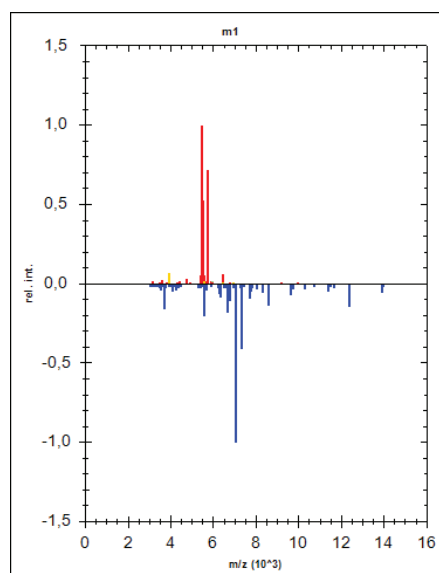
Skupina IV pozostáva len s jedného zástupcu, kmeňa CCY 17-3-13. Jeho hmotnostné spektrum sa výrazne líši od všetkých ostatných spektier. Tento kmeň podľa hodnoty skóre s určitosťou nepatrí do skupiny I, keďže hodnota skóre s typovým *Cryptococcus laurentii* bola len 0,455 (**Obr. 20**). Až sekvenčnou analýzou D1/D2 domény LSU rRNA génu bolo zistené, že kmeň CCY 17-3-13 je *Cryptococcus carnescens*, t.j. kvasinka patriaca do II. fylogenetickéj skupiny *Cryptococcus laurentii*.



Obr. 20: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-13 s CCY 17-3-2 (skóre 0,455).

5.2.5 Skupina V

Do skupiny V bol na základe MS spektra zaradený len jeden kmeň (CCY 17-3-5), ktorého hmotnostné spektrum podľa hodnoty skóre, ale i na základe vizuálneho porovnania nezodpovedalo ostatným hmotnostným spektrám. S typovým *Cryptococcus laurentii* bola hodnota skóre len 0,201 (**Obr. 21**). Sekvenčnou analýzou D1/D2 domény LSU rRNA génu bolo zistené, že kmeň CCY 17-3-5 je *Cryptococcus flavus*, ktorý vôbec nepatrí do skupiny *Cryptococcus laurentii*.



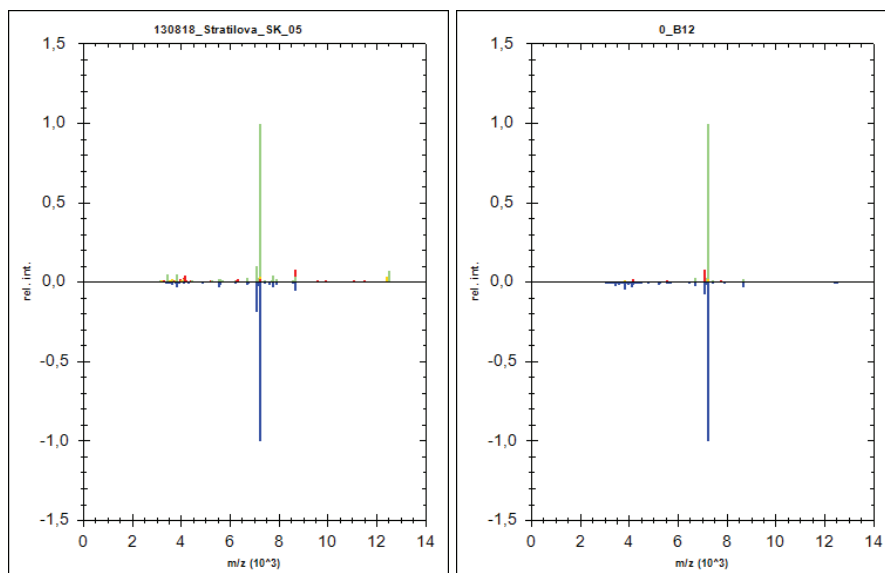
Obr. 21: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-5 s CCY 17-3-2 (skóre 0,201).

5.2.6 Skupina VI

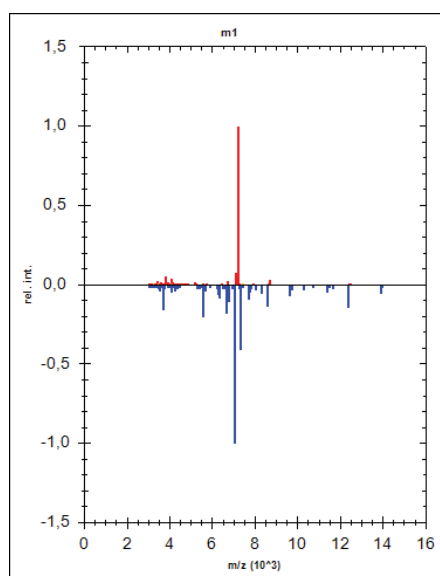
Zvyšné tri kmene, ktorých hmotnostné spektrá neboli priradené do žiadnej z vyššie zmienených skupín, boli zaradené do novej skupiny, skupiny VI. MS spektrá týchto troch kmeňov (CCY 17-3-35, CCY 17-3-36 a CCY 17-3-37), pôvodne zaradených medzi

Cryptococcus laurentii, sa výrazne odlišujú od MS spektier ostatných biotypizovaných kmeňov, ale navzájom sú si veľmi podobné. Hodnota skóre s typovým *Cryptococcus laurentii* bola veľmi nízka, napr. CCY 17-3-35 mal s typovým CCY 17-3-2 hodnotu skóre rovnú nule (**Obr. 23**).

Sekvenčnou analýzou D1/D2 domény LSU rRNA génu bolo dokázané, že sa skutočne nejedná o kmene skupiny *Cryptococcus laurentii*, ale všetky tri spomínané kmene patria do príbuzného druhu *Bulleromyces albus*.



Obr. 22: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-35 vľavo s CCY 17-3-36 (skóre 2,244), vpravo s CCY 17-3-37 (skóre 2,155).

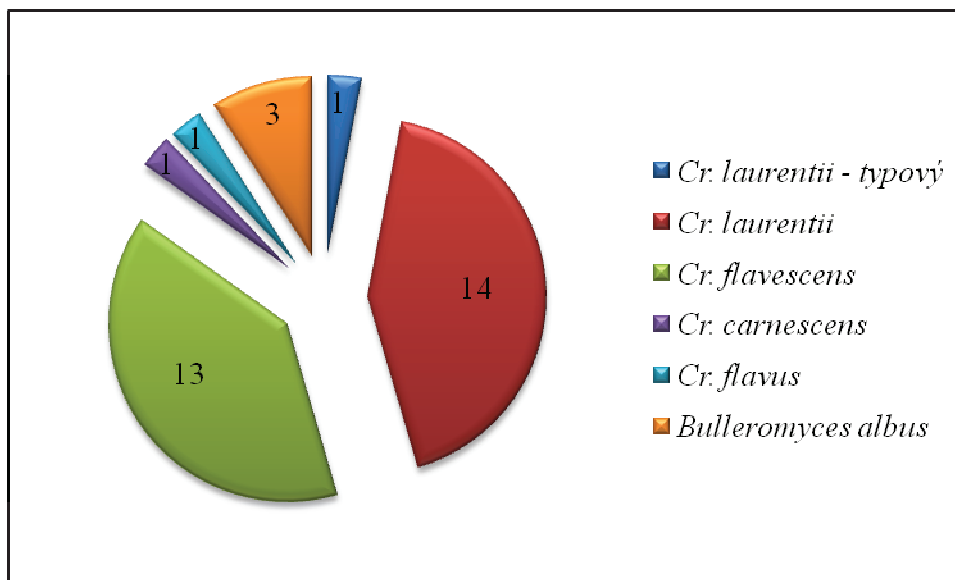


Obr. 23: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-35 s CCY 17-3-2 (skóre 0).

5.2.7 Zastúpenie druhov v rámci pôvodnej skupiny *Cryptococcus laurentii*

V procese bipotypizácie kvasiniek skupiny *Cr. laurentii* bolo získaných 33 hmotnostných spektier. Podľa hodnoty skóre a podobnosti hlavných pík s vysokou intenzitou boli tieto hmotnostné spektrá rozdelené do šiestich skupín. Najpočetnejšie zastúpenie má skupina II

(14 kmeňov), ktorej zástupcovia boli identifikovaní ako *Cr. laurentii* (**Obr. 24**), nasleduje skupina III (13 kmeňov). Kmene tejto skupiny boli identifikované ako *Cr. flavescens*. *Cryptococcus carnescens*, ktorý spolu s *Cr. flavescens* a *Cr. laurentii* patrí do skupiny *Cryptococcus laurentii* bol reprezentovaný len jedným kmeňom. *Cr. flavus*, ktorý spolu s *Bulleromyces albus* (3 kmene) vôbec nepatrí do skupiny *Cryptococcus laurentii* bol zastúpený jedným kmeňom.



Obr. 24: Pomerné zastúpenie kmeňov pôvodne označených ako *Cr. laurentii* usporiadaných podľa typu spektra ich ribozomálnych proteínov.

6 ZÁVER

V rámci vypracovania tejto diplomovej práce sme si stanovili dva hlavné ciele. Prvým cieľom bolo optimalizovanie pracovného postupu na biotypizáciu kvasiniek rodu *Cryptococcus*. Optimalizovaný postup mal byť prispôsobený potrebám Zbierky kultúr kvasiniek na Chemickom ústave SAV (CCY), aby mohol v budúcnosti slúžiť na rýchlu, lacnú a spoľahlivú identifikáciu nových kmeňov. Druhým hlavným cieľom bola vlastná biotypizácia kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii*.

V procese optimalizácie metódy sa testoval vplyv kultivačného média, doby kultivácie, premývania buniek destilovanou vodou alebo etanolom. Porovnávali sa rôzne spôsoby extrakcie, pričom sa intracelulárne proteíny extrahovali kyselinou mravčou alebo kyselinou trifluóroctovou, ktorá bola zložkou roztoku MALDI matrice. Testovala sa i dĺžka extrakcie, extrahovalo sa 5 minút, alebo 30 minút. Optimalizovalo sa i zloženie MALDI matrice a nanášanie vzoriek na MALDI platňu.

Bol zistený vplyv kultivačného média na výsledné hmotnostné spektrá. Pri vytváraní knižnice hmotnostných spektier by preto mali byť všetky mikroorganizmy kultivované na tom istom médiu. Za optimálne kultivačné médium pre potreby Zbierky kultúr kvasiniek považujeme sladínový agar.

Dospeli sme k záveru, že dĺžka kultivácie po narastení kultúry nemá zásadný vplyv na výsledné hmotnostné spektrum. Optimálna dĺžka kultivácie bola stanovená na 4 dni.

Jednonásobné premývanie buniek etanolom s následným jednonásobným premytím destilovanou vodou sa neosvedčilo, ale viacnásobné premytie buniek destilovanou vodou malo zásadný vplyv na kvalitu výsledných hmotnostných spektier. Za optimálny počet považujeme sedem premytí. Vzorka je potom zbavená množstva kontaminantov a hmotnostné spektrum je reprodukovateľnejšie.

Pri sledovaní vplyvu dĺžky extrakcie proteínov sme dospeli k záveru, že hoci je päťminútová extrakcia časovo výhodná, neposkytuje tak charakteristické a bohaté MALDI hmotnostné spektrá ako tridsaťminútová extrakcia. Dĺžka extrakcie bola preto stanovená na 30 minút. Proteíny sa extrahovali 70% kyselinou mravčou alebo priamo roztokom zmesnej matrice.

Sledoval sa i vplyv koncentrácie ACN, TFA, SA a FA v roztoku zmesnej MALDI matrice. Na extrakciu boli použité matrice s týmito výslednými koncentraciami: 70% a 50% ACN, 3% a 0,75% TFA, 30 mg/ml a 15 mg/ml pre SA a 10 mg/ml a 5 mg/ml pre FA. Vzhľadom na získané spektrá a v rámci šetrenia chemikálií (financií) za optimálne považujeme použitie matrice s nižšími výslednými koncentraciami SA, FA a TFA, ale s vyššou koncentráciou ACN. Nami navrhnutá MALDI matrica je teda zmesou 70% ACN a 0,75% TFA, ktorá obsahuje 15 mg/ml SA a 5 mg/ml FA.

Čo sa týka spôsobu nanášania vzoriek na MALDI platňu v prípade extrakcie kyselinou mravčou, najlepšie hmotnostné spektrá boli získané v prípade naniesenia vzorky na MALDI platňu a po vysušení jej prevrstvení MALDI matricou.

Za najoptimálnejší postup spracovania vzoriek kvasiniek rodu *Cryptococcus* považujeme teda odber kolónií v štvrtý deň, ich 7násobné premytie destilovanou vodou, extrakciu zmesnou matricou (30 mg/ml SA:10 mg/ml FA = 1:1; 100% ACN:2,5% TFA = 7:3) a po 30 minútach a následnej centrifugácii napipetovanie 1 µl supernatantu na MALDI platňu. MALDI – TOF hmotnostná spektrometria bola uskutočnená v rozsahu od 2 000 do 22 000 Da, v pozitívnom lineárnom móde na zariadení Bruker UltrafleXtreme.

Optimalizovaná metóda bola testovaná na troch kmeňoch *Cr. neoformans*, troch kmeňoch *Cr. magnus* a náhodne vybraných deviatich kmeňoch zaradených do CCY ako *Cr. laurentii*.

Optimalizovaným postupom bolo identifikovaných tridsaťtri kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek pôvodne zaradených ako *Cryptococcus laurentii*. Získaných tridsaťtri hmotnostných spektier bolo navzájom porovnaných. Vizualne porovnanie spektier bolo uskutočnené v programe mMass - Open Source Mass Spectrometry Tool. Hodnota skóre, ktorá udáva mieru podobnosti dvoch hmotnostných spektier bola získaná v programe MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH). Podľa hodnoty skóre, ale i na základe vizuálneho porovnania boli hmotnostné spektrá roztriedené do šiestich skupín. V jednotlivých skupinách boli kvasinky identifikované sekvenčnou analýzou D1/D2 domény LSU rRNA génu, na základe ktorej sa k danému typu hmotnostného spektra priradil taxonomický status. Zo všetkých identifikovaných kmeňov len pätnásť z pôvodne zaradených ako *Cryptococcus laurentii* patrilo k tomuto druhu, pričom štrnásť z nich poskytovalo takmer identické spektrum (skupina II), ktoré sa výrazne líšilo od typového *Cr. laurentii* (skupina I). Zvyšných osemnásť kmeňov bolo preklasifikovaných. Trinásť kmeňov bolo preradených medzi zástupcov druhu *Cryptococcus flavescentis* a jeden kmeň bol identifikovaný ako *Cryptococcus carnescentis*. Tieto kmene patria do I. resp. II. fylogenetickej skupiny *Cr. laurentii*. Okrem toho jeden kmeň bol zaradený ako *Cryptococcus flavus* a tri kmene boli preklasifikované do druhu *Bulleromyces albus*. Posledné štyri kmene do skupiny *Cr. laurentii* vôbec nepatria.

Výsledky tejto diplomovej práce boli prezentované na fóre o hmotnostnej spektrometrii v Viedni [113] a na 41. Výročnej konferencii o kvasinkách v Smoleniciach [114].

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] KURTZMAN, C.P. a J. W. FELL. *The yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. New York: Elsevier, c2000, xvi, 1082 p. ISBN 04-448-1312-8.
- [2] RENKER, C, V BLANKE, B BORSTLER, J HEINRICHS a F BUSCOT. Diversity of and yeasts (Basidiomycota) inhabiting arbuscular mycorrhizal roots or spores. *FEMS Yeast Research*. 2004, vol. 4, issue 6. DOI: 10.1016/j.femsyr.2004.01.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713560400008X>
- [3] SOARES, M. C. B., et al. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2005, vol. 47, issue 1. DOI: 10.1590/S0036-46652005000100006.
- [4] KREGER-VAN RIJ, N. *The Yeasts: a taxonomic study*. 3rd rev. and enl. ed. sole distributors for the USA and Canada, Elsevier Science Pub. Co., 1984, xvi, 1082 p. ISBN 04-448-0421-8.
- [5] KURTZMAN, C. P., J. W. FELL, T. BOEKHOUT. *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Editor C Kurtzman, Jack W Fell, Teunis Boekhout. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2011, s. i-xvi, 1339-2080. ISBN 978-012-3848-680.
- [6] PIROFSKI, L.A., A. CASADEVALL. *Cryptococcus neoformans*: Paradigm for the Role of Antibody Immunity Against Fungi?. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1996, vol. 284, issue 4, s. 475-495. DOI: 10.1016/S0934-8840(96)80001-6.
- [7] DROUHET, E. Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. *Journal De Mycologie Medicale*. 1997, roč. 7, č. 1, s. 10-27.
- [8] KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the Sexual State of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*. 1976, vol. 68, no .4, s. 821-833. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/3758800>
- [9] KWON-CHUNG, K.J. a T.J POPKIN. Ultrastructure of septal complex in *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). *Jurnal of Bacteriology*. 1976, vol. 126, no. 1, s. 524-528. Dostupné z: <http://jb.asm.org/content/126/1/524.long>
- [10] LENGELER, K. B., G. M. COX a J. HEITMAN. Serotype AD Strains of *Cryptococcus neoformans* Are Diploid or Aneuploid and Are Heterozygous at the Mating-Type Locus. *Infection and Immunity*. 2001-01-01, vol. 69, issue 1, s. 115-122. DOI: 10.1128/IAI.69.1.115-122.2001.
- [11] HULL, C. M., M.-J. BOILY a J. HEITMAN. Sex-Specific Homeodomain Proteins Sxi1 and Sxi2a Coordinately Regulate Sexual Development in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*. 2005-03-08, vol. 4, issue 3, s. 526-535. DOI: 10.1128/EC.4.3.526-535.2005.

- [12] MITCHELL, T.G. a J.R. PERFECT. Cryptococcosis in the Era of AIDS—100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical microbiology review*. 1995, vol.8, no.4, s. 518-548.
- [13] TAKASHI, S., et. al. Intraspecies Diversity of *Cryptococcus laurentii* as Revealed by Sequences of Internal Transcribed Spacer Regions and 28S rRNA Gene and Taxonomic Position of *C. laurentii* Clinical Isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2000, vol.39, no. 8, 1468–1471. Dostupné z: file:///C:/Users/Biotyping/Downloads/jm001468.pdf
- [14] FELL, Jack W., Teun BOEKHOUT, Alvaro FONSECA, Gloria SCORZETTI a Adele STATZELL-TALLMAN. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000, roč. 50, 1351–1371.
- [15] TAKASHIMA, M. a T. NAKASE. Molecular phylogeny of the genus *Cryptococcus* and related species based on the sequences of 18S rDNA and internal transcribed spacer regions. *Microbiol. Cult. Coll.* 1999, vol. 15, no. 2, p. 35-47.
- [16] GUÉHO, E., L. IMPROVISI, R. CHRISTEN a G.S. DE HOOG. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1993, roč. 63, s. 175-189.
- [17] HEITMAN, Joseph, et al. The *Cryptococcus neoformans* genome sequencing project. *Mycopathologia*. 1999, roč. 148, č. 1, s. 1-7.
- [18] MARTINEZ, Diego, et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology*. 2004-5-2, vol. 22, issue 6, s. 1-7. DOI: 10.1038/nbt967.
- [19] LOFTUS, B. J., et al. The Genome of the Basidiomycetous Yeast and Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*. 2005-02-25, vol. 307, issue 5713, s. 1321-1324. DOI: 10.1126/science.1103773.
- [20] CASADEVALL, Arturo, et al. ‘Ready made’ virulence and ‘dual use’ virulence factors in pathogenic environmental fungi — the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology*. 2003, vol. 6, issue 4, s. 332-337.
- [21] CLEARE, W., A. CASADEVALL, et al. Scanning electron microscopy of encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans* and the effect of glucose on capsular polysaccharide release 1. *Medical Mycology*. 1999, vol. 37, issue 4, s. 332-337. DOI: 10.1111/j.1365-280X.1999.00226.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-280X.1999.00226.x>
- [22] DOERING, Tamara L., A. CASADEVALL, et al. How does *Cryptococcus* get its coat?. *Trends in Microbiology*. 2000, vol. 8, issue 12, s. 547-553. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)01890-4.

- [23] BOSE, I., A. J. REESE, J. J. ORY, G. JANBON, et al. A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*. 2003-08-01, vol. 2, issue 4, s. 655-663. DOI: 10.1128/EC.2.4.655-663.2003.
- [24] KOZEL, T. R., G. S. T. PFROMMER, et al.. Role of the Capsule in Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Infectious Diseases*. 1988-05-01, vol. 10. DOI: 10.1093/cid/10.Supplement_2.S436.
- [25] DEL POETA, M. Role of Phagocytosis in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*. 2004-10-06, vol. 3, issue 5, s. 1067-1075. DOI: 10.1128/EC.3.5.1067-1075.2004.
- [26] IKEDA, R., T. SUGITA, E. S. JACOBSON a T. SHINODA. Laccase and Melanization in Clinically Important *Cryptococcus* Species Other than *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002-04-01, vol. 40, issue 4. DOI: 10.1128/JCM.40.4.1214-1218.2002.
- [27] JACOBSON, E. S., T. SUGITA, E. S. JACOBSON a T. SHINODA. Pathogenic Roles for Fungal Melanins. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000-10-01, vol. 13, issue 4, s. 1214-1218. DOI: 10.1128/CMR.13.4.708-717.2000.
- [28] NOSANCHUK, Joshua D. a Arturo CASADEVALL. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. *Microbiology*. 2003-07-01, vol. 149, issue 7, s. 1945-1951. DOI: 10.1099/mic.0.26333-0.
- [29] IKEDA, Reiko, Takashi SUGITA, Eric S. JACOBSON a Takako SHINODA. Effects of Melanin upon Susceptibility of *Cryptococcus* to Antifungals. *Microbiology and Immunology*. 2003, vol. 47, issue 4. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03395.x.
- [30] KOZEL, Thomas R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*. 1995, vol. 3, issue 8. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)88957-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X0088957X>
- [31] BUCHANAN, K. L. a J. W. MURPHY. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?. *Emerg Infect Dis*. 1998, roč. 4, č. 1, s. 71-83.
- [32] STEENBERGEN, Judith N. a Arturo CASADEVALL. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes and Infection*. 2003, vol. 5, issue 7, s. 667-675. DOI: 10.1016/S1286-4579(03)00092-3.
- [33] WRIGHT, Lesley C., Jackie PAYNE, et al. Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. *Biochemical Journal*. 2004, vol. 384, issue 2, s. 377-384. DOI: 10.1042/BJ20041079.
- [34] COX, G. M., J. MUKHERJEE, G. T. COLE, A. CASADEVALL a J. R. PERFECT. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infection and Immunity*. 2000-02-01, vol. 68, issue 2, s. 443-448. DOI: 10.1128/IAI.68.2.443-448.2000.

- [35] FOX, D. S., G. M. COX, J. HEITMAN, A. CASADEVALL a J. R. PERFECT. Phospholipid-Binding Protein Cts1 Controls Septation and Functions Coordinately with Calcineurin in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*. 2003-10-01, vol. 2, issue 5, s. 443-448. DOI: 10.1128/EC.2.5.1025-1035.2003.
- [36] MIYAGAWA, T., S. HAMAGAMI a N. TANIGAWA. *Cryptococcus albidus*-induced Summer-type Hypersensitivity Pneumonitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000, vol. 161, issue 3, s. 961-966. DOI: 10.1164/ajrccm.161.3.9802013.
- [37] RIMEK, D., G. HAASE, A. LUCK, J. CASPER a A. PODBIELSKI. First Report of a Case of Meningitis Caused by *Cryptococcus adeliensis* in a Patient with Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004-01-08, vol. 42, issue 1, s. 481-483. DOI: 10.1128/JCM.42.1.481-483.2004.
- [38] BICANIC, T. a T.S. HARRISON. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin*. 2005-04-21, vol. 72, issue 1, s. 99-118. DOI: 10.1093/bmb/ldh043.
- [39] MAMIDI, A., J.A. DESIMONE a R.J. POMERANTZ. Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. *Journal of Neurovirology*. 2002, vol. 8, issue 3, s. 158-167. DOI: 10.1080/13550280290049723.
- [40] FRIEDMAN, Gary D., W. JEFFREY FESSEL, Natalia V. UDALTSOVA a HURLEY. Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. *Mycoses*. 2005, vol. 48, issue 2, s. 122-125. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2004.01082.x.
- [41] SAAG, M. S., R. J. GRAYBILL, et al. Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2000-04-01, vol. 30, issue 4, s. 710-718. DOI: 10.1086/313757.
- [42] BARNETT, J.A., R.W. PAYNE a D. YARROW. *Yeasts: characteristics and identification*. 3rd ed. New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2000, xviii, 1055 p. ISBN 05-215-7396-3.
- [43] BAPTIST, J. N. a C. P. KURTZMAN. Comparative Enzyme Patterns in *Cryptococcus laurentii* and Its Taxonomic Varieties. *Mycologia*. 1976, roč. 68, č. 6, s. 1195-1203.
- [44] SMIT, E. J., et al. Taxonomic Relationships of *Cryptococcus* and *Tremella* Based on Fatty Acid Composition and Other Phenotypic Characters. *Microbiology*. 1988-10-01, vol. 134, issue 10, s. 2849-2855. DOI: 10.1099/00221287-134-10-2849.
- [45] TAKASHIMA, M. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2003, vol. 53, issue 4, s. 1187-1194. DOI: 10.1099/ijms.0.02498-0.
- [46] MIDDELHOVEN, Wouter J. *Cryptococcus allantoinivorans* sp.nov., an anamorphic basidiomycetous yeast (Tremellales) physiologically resembling other species of the *Cryptococcus laurentii* complex that degrade polysaccharides and C2

- compounds. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2005, vol. 87, issue 2. DOI: 10.1007/s10482-004-1728-y. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-004-1728-y>.
- [47] KIMURA M. A simple method for estimation evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Jurnal of Molecular Evolution*. 1980;16:111–120.
 - [48] MARCHANT, Y.Yoke a G.H.N. TOWERS. Phototoxicity of polyacetylenes to *Cryptococcus laurentii*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1986, vol. 14, issue 6, s. 565-568. DOI: 10.1016/0305-1978(86)90034-7.
 - [49] KOTZEKIDOU, P. Identification of yeasts from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiology*. 1997, vol. 14, issue 6, s. 609-616. DOI: 10.1006/fmic.1997.0133.
 - [50] MUSSA, A.Y., H.S. RANDHAWA a Z.U. KHAN. Decaying wood as a natural habitat of melanin-forming (Mel⁺) variant of *Cryptococcus laurentii*. *Current Science*. 2000, roč. 79, č. 10, s. 1471-1473.
 - [51] SALDANHA-DA-GAMA, A, M MALFEITO-FERREIRA a V LOUREIRO. Characterization of yeasts associated with Portuguese pork-based products. *International Journal of Food Microbiology*. 1997, vol. 37, 2-3, s. 201-207. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00078-0.
 - [52] TOSI, S., et al. Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biology*. 2002, roč. 25, č. 4.
 - [53] KURTZMAN, C.P. Formation of Hyphae and Chlamydospores by *Cryptococcus laurentii*. *Mycologia*. 1973, roč. 65, č. 2, s. 388-395.
 - [54] RHODES, J.C., K.J. KWON-CHUNG a T.J. POPKIN. Ultrastructure of the septal complex in hyphae of *Cryptococcus laurentii*. *Jurnal of Bacteriology*. 1981, roč. 145, č. 3, 1410–1412.
 - [55] BOTES, Adriana L., Jeanette LOTTER, Owen H.J. RHODE a Alfred BOTHA. Interspecies differences in the enantioselectivity of epoxide hydrolases in *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C.E. Skinner and *Cryptococcus podzolicus* (Bab'jeva & Reshetova) Golubev. *Systematic and Applied Microbiology*. 2005, vol. 28, issue 1, s. 27-33. DOI: 10.1016/j.syapm.2004.10.003.
 - [56] ZLATANOV, M., K. PAVLOVA, G. ANTOVA, M. ANGELOVA-ROMOVA, K. GEORGIEVA a S. ROUSENOVA-VIDEVA. Biomass Production by Antarctic Yeast Strains: An Investigation on the Lipid Composition. *Biotechnology*. 2010-11-1, vol. 24, issue 4, s. 2096-2101. DOI: 10.2478/V10133-010-0084-5.
 - [57] BAE, M., T.H. LEE, H. YOKOYAMA, H.G. BOETTGER a C.O. CHICHESTER. The occurrence of plectanixanthin in *Cryptococcus laurentii*. *Phytochemistry*. 1972, vol. 11, issue 7, s. 2367-2369. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)88422-8.

- [58] SCHULTZ, J.C. Biosynthesis of glycogen and starch in *Cryptococcus laurentii*. *Journal of Bacteriology*. 1973, roč. 113, č. 2, s. 627-636.
- [59] LIMA, G., S. ARRUE, et al. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 1999, roč. 23, s. 223-229.
- [60] VERO, S, P MONDINO, J BURGUEÑO, M SOUBES. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*. 2002, vol. 26, issue 1, s. 91-98. DOI: 10.1016/S0925-5214(01)00199-5.
- [61] QIN, Guozheng, Shiping TIAN, Yong XU, M. SOUBES a M. WISNIEWSKI. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 2004, vol. 31, issue 1, s. 51-58. DOI: 10.1016/S0925-5214(03)00130-3.
- [62] YAO, Hongjie, Shiping TIAN a Yousheng WANG. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, vol. 93, issue 3. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.11.011.
- [63] MCCORMACK, P.J., H.G WILDMAN a P. JEFFRIES. Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, roč. 60, č. 3, s. 927-931.
- [64] KRAJDEN, S.: Normally Saprobic Cryptococci Isolated from *Cryptococcus neoformans* Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991, roč. 29, č. 9, s. 1883-1887.
- [65] JOHNSON, L.B., S.F. BRADLEY a C.A. KAUFFMAN. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. *Mycoses*. 1998, roč. 41, 7-8, s. 277-280.
- [66] AVERBUCH, D., T. BOEKHOUT, R. FALK, D. ENGELHARD, M. SHAPIRO, C. BLOCK a I. POLACHEK. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. *Medical Mycology*. 2002, vol. 40, issue 5, s. 479-484. DOI: 10.1080/mmy.40.5.479.484.
- [67] MANFREDI, Roberto, et al. Emergence of Amphotericin B-Resistant *Cryptococcus laurentii* Meningoencephalitis Shortly After Treatment for *Cryptococcus neoformans* Meningitis in a Patient with AIDS. *AIDS Patient Care and STDs*. 2006, vol. 20, issue 4, s. 227-232. DOI: 10.1089/apc.2006.20.227
- [68] DECOSTERE, A., et al. First report on *Cryptococcus laurentii* associated with feather loss in a glossy starling (*Lamprolornis chalybaeus*). *Avian Pathology*. 2003, vol. 32, issue 3, s. 309-311. DOI: 10.1080/0307945031000097921.
- [69] VANCANNEYT, M., R. COOPMAN, R. TYTGAT, G.L. HENNEBERT Whole-cell Protein Patterns, DNA Base Compositions and Coenzyme Q Types in the Yeast Genus

- Cryptococcus Kützing and Related Taxa. *Systematic and Applied Microbiology*. 1994, vol. 17, issue 1, s. 65-75. DOI: 10.1016/S0723-2020(11)80033-0.
- [70] BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 1999, vol. 147, no. 4, p. 891-907.
- [71] GAO, Lingmei et al. Inulinase-producing Marine Yeasts: Evaluation of their Diversity and Inulin Hydrolysis by Their Crude Enzymes. *Microbial Ecology*. 2007-10-23, vol. 54, issue 4, s. 722-729. DOI: 10.1007/s00248-007-9231-4.
- [72] SCORZETTI, Gloria, J.W. FELL, A FONSECA a Adele STATZELL-TALLMAN. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*. 2002, vol. 2, issue 4, s. 495-517. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2002.tb00117.x.
- [73] SAMPAIO, J. P. et al *Auriculibuller fuscus* gen. nov., sp. nov. and *Bullera japonica* sp. nov., novel taxa in the Tremellales. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2004-05-01, vol. 54, issue 3, s. 987-993. DOI: 10.1099/ijs.0.02970-0.
- [74] GILDEMACHER, P., B. HEIJNE, M. SILVESTRI, J. HOUBRAKEN, E. HOEKSTRA, B. THEELEN. Interactions between yeasts, fungicides and apple fruit russetting. *FEMS Yeast Research*. 2006, vol. 6, issue 8, s. 1149-1156. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00109.x.
- [75] CHALUPOVÁ, Jana, Michaela SEDLÁŘOVÁ, Michaela HELMEL, Pavel ŘEHULKA, Martina MARCHETTI-DESCHMANN, Günter ALLMAIER a Marek ŠEBELA. MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews. *Journal of Mass Spectrometry*. 2012, vol. 47, issue 8, s. 978-986. DOI: 10.1002/jms.3046.
- [76] MILLAR, B. C., J. XU a J. E. MOORE. Molecular Diagnostics of Medically Important Bacterial Infections. *Curr Issues Mol Biol*. 2007, roč. 9, s. 21-39.
- [77] HO, Y.-P. a M. REDDY. Identification of Pathogens by Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2010-03-26, vol. 56, issue 4, s. 525-536. DOI: 10.1373/clinchem.2009.138867.
- [78] DEMIREV, Plamen A. a Catherine FENSELAU. Mass Spectrometry for Rapid Characterization of Microorganisms. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2008, vol. 1, issue 1, s. 71-93. DOI: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.112838.
- [79] DHIMAN, N., et al. Performance and Cost Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Routine Identification of Yeast. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011-04-04, vol. 49, issue 4, s. 1614-1616. DOI: 10.1128/JCM.02381-10.
- [80] MADONNA, Angelo J., Sheila Van CUYK. Detection of *Escherichia coli* using immunomagnetic separation and bacteriophage amplification coupled with matrix-

- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2003-02-15, vol. 17, issue 3, s. 257-263. DOI: 10.1002/rcm.900. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.900>.
- [81] LIN, Chun-Cheng, et. al. Selective Binding of Mannose-Encapsulated Gold Nanoparticles to Type 1 Pili in Escherichia coli. *Journal of the American Chemical Society*. 2002, vol. 124, issue 14, s. 3508-3509. DOI: 10.1021/ja0200903.
 - [82] ALFONSO, C. a C. FENSELAU. Use of Bioactive Glass Slides for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Analysis: Application to Microorganisms. *Analytical Chemistry*. 2003, 75 (3), s. 694-697.
 - [83] SENG, P., M. DRANCOURT, et al. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, vol. 49, issue 4. DOI: 10.1086/600885.
 - [84] FENSELAU, Catherine, et al. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2001, vol. 20, issue 4, s. 157-171. DOI: 10.1002/mas.10004. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112838>.
 - [85] LAY, Jackson O., et al. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2001, vol. 20, issue 4, s. 157-171. DOI: 10.1002/mas.10003.
 - [86] DEMIREV, Plamen A., Catherine FENSELAU, et al. Mass spectrometry in biodefense: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2008, vol. 43, issue 11, s. 1441-1457. DOI: 10.1002/jms.1474.
 - [87] STEPHAN, Roger et al. Rapid species specific identification and subtyping of Yersinia enterocolitica by MALDI-TOF Mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*. 2011, vol. 87, issue 2, s. 150-153. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.08.016.
 - [88] MARKLEIN, G., et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009-08-31, vol. 47, issue 9, s. 2912-2917. DOI: 10.1128/JCM.00389-09.
 - [89] STEVENSON, L. G., et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Clinically Important Yeast Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010-09-30, vol. 48, issue 10, s. 3482-3486. DOI: 10.1128/JCM.00687-09.
 - [90] CHERKAoui, A., et al. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic

- Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010-03-30, vol. 48, issue 4, s. 1169-1175. DOI: 10.1128/JCM.01881-09.
- [91] JAMAL, W. Y., M. SHAHIN a V. O. ROTIMI. Comparison of two matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry methods and API 20AN for identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Journal of Medical Microbiology*. 2013-03-15, vol. 62. DOI: 10.1099/jmm.0.053256-0.
- [92] KOLECKA, A. et al Efficient identification of *Malassezia* yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *British Journal of Dermatology*. 2014, vol. 170, issue 2, s. 332-341. DOI: 10.1111/bjd.12680.
- [93] SHEPARD, J. R., et al. Multicenter Evaluation of the *Candida albicans*/*Candida glabrata* Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization Method for Simultaneous Dual-Color Identification of *C. albicans* and *C. glabrata* Directly from Blood Culture Bottles. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008-01-07, vol. 46, issue 1, s. 50-55. DOI: 10.1128/JCM.01385-07.
- [94] GORDON M., et al. Clinical impact of rapid identification and susceptibility testing of bacterial blood culture isolates. *Journal of clinical microbiology*. 1989, vol. 27, issue 6, s. 1342-1345.
- [95] SPANU, T. et al Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry Assay of Blood Culture Broths for Rapid Identification of *Candida* Species Causing Bloodstream Infections: an Observational Study in Two Large Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011-12-27, vol. 50, issue 1, s. 176-179. DOI: 10.1128/JCM.05742-11.
- [96] WEINSTEIN, M. P., et al. The Clinical Significance of Positive Blood Cultures in the 1990s: A Prospective Comprehensive Evaluation of the Microbiology, Epidemiology, and Outcome of Bacteremia and Fungemia in Adults. *Clinical Infectious Diseases*. Washington: American Society for Microbiology, 1997, vol. 24, issue 4, s. 1342-1345. DOI: 10.1093/clind/24.4.584.
- [97] BRUKER DALTONIK GMBH. *MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2*. February 2011.
- [98] McTAGGART, L. R., E. LEI, S. E. RICHARDSON, L. HOANG, A. FOTHERGILL a S. X. ZHANG. Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011-07-28, vol. 49, issue 8. DOI: 10.1128/JCM.00651-11.
- [99] GROSS, Jürgen H. *Mass spectrometry: a textbook*. Berlin: Springer, c2004, xviii, 518 s. ISBN 35-404-0739-1.
- [100] JONAS, J.: *Hmotnostní spektroskopie*, 1. vyd., Praha, Státní pedagogické naklad., 1985, 111 s.

- [101] VOLKA, K. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. ISBN 80-708-0227-8.
- [102] SOMMER, L.: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 348 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [103] HOLCAPEK, M.: *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze* (prednášky k výuce – Univerzita Pardubice) [online]. 2012 [cit. 2. 2. 2014]. Dostupné z: <<http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>>.
- [104] COHEN, Steven L. a Brian T. CHAIT. Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins. *Anal. Chem.* 1996, roč. 68, s. 31-37. Dostupné z: http://lab.rockefeller.edu/chait/pdf/96/96_cohen_anal-chem.pdf
- [105] Matrix Substances for MALDI-MS. *Sigma - Aldrich* [online]. [cit. 2014-04-04]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=103431784>
- [106] *Hmotnostní spektrometrie*. 1. vyd. Editor Jan Vřešťál. Brno: Masarykova univerzita, 113 s. ISBN 80-210-1835-6.
- [107] HIPPLER, R., et al. *Low Temperature Plasma Physics, Fundamental Aspects and Applications*, Berlin, Wiley-VCH, 2001, 523 s.: ISBN 3-527-28887-2.
- [108] ŠTULÍK, K. a kol.: *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [109] YAN, Y., Y. HE, T. MAIER, C. QUINN, et al. Improved Identification of Yeast Species Directly from Positive Blood Culture Media by Combining Sepsityper Specimen Processing and Microflex Analysis with the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Biotyper System. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011-06-30, vol. 49, issue 7, s. 2528-2532. DOI: 10.1128/JCM.00339-11.
- [110] BIZZINI, A., et al. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010-04-29, vol. 48, issue 5, s. 1549-1554. DOI: 10.1128/JCM.01794-09.
- [111] FERRONI, A., et al. Real-Time Identification of Bacteria and Candida Species in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010-04-29, vol. 48, issue 5, s. 1549-1554. DOI: 10.1128/JCM.02485-09.
- [112] KURTZMAN, C.P. a C.J. ROBNETT. Identification of Clinically Important Ascomycetous Yeasts Based on Nucleotide Divergence in the 5' End of the Large-Subunit (26S) Ribosomal DNA Gene. *Journal of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, 1997, vol. 35, no. 5, s. 1216-1223.

- [113] JÄGER, Jakub, Barbora STRATILOVÁ, Pavel ŘEHULKA a Eva STRATILOVÁ. *Biotyping of Cryptococcus laurentii group*. MassSpec-Forum Viena: University of Viena, Faculty of Chemistry, 2014.
- [114] JÄGER, Jakub, Barbora STRATILOVÁ, Jana MOLNÁROVÁ, Pavel ŘEHULKA, Jiřina OMELKOVÁ, Renáta VADKERTIOVÁ a Eva STRATILOVÁ. *MS based identification of Cryptococcus laurentii group*. 41. Výročná konferencia o kvasinkách: DVP Smolenice, 2014.

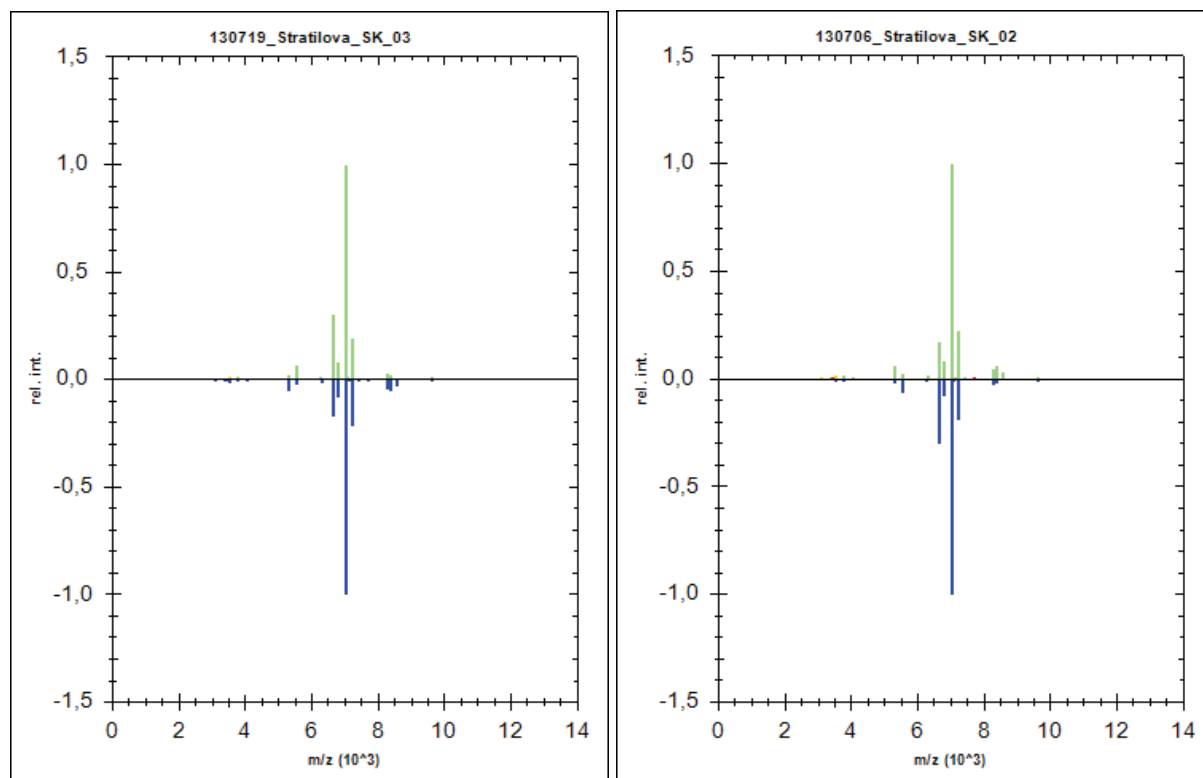
8 PRÍLOHY

8.1 Príprava vzoriek podľa Bruker protokulu pre obtiažné prípady [97]

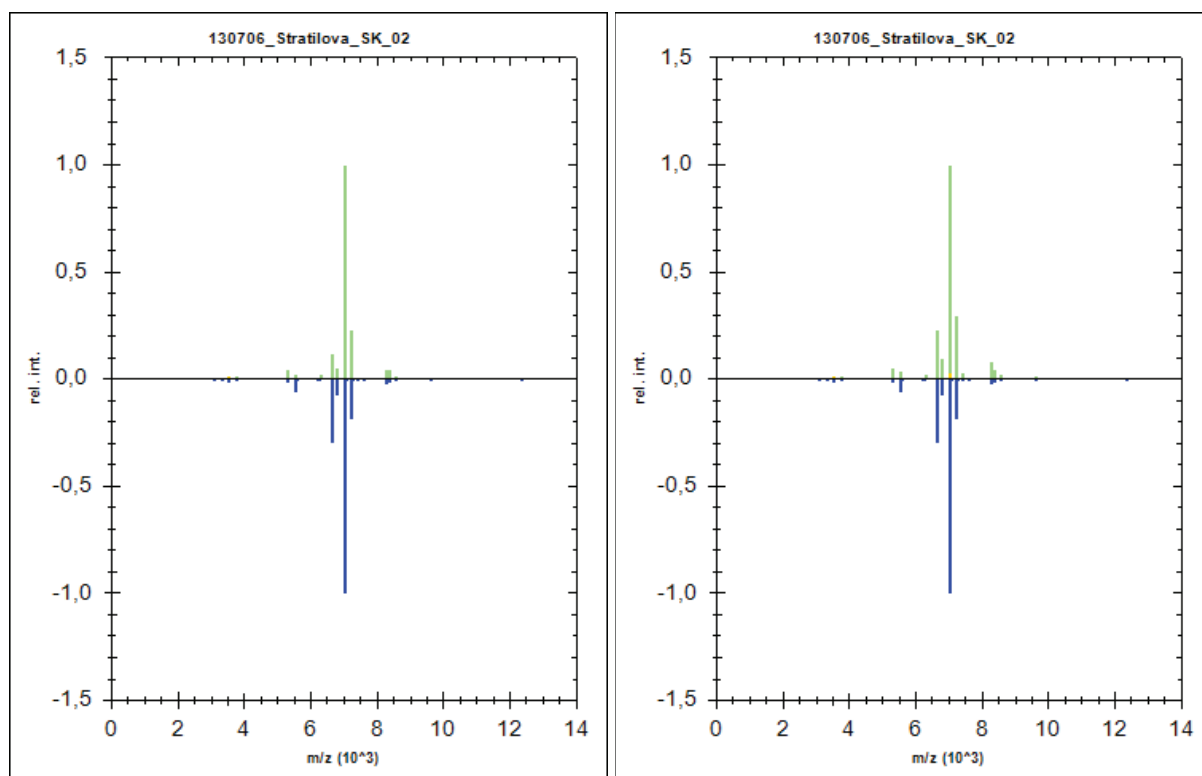
1. Napipetuj 300 μl destilovanej vody do čistej mikro skúmavky.
2. Sterilne premiestni jednu kolóniu biologického materiálu do skúmavky.
3. Homogenizuj minimálne jednu minútu.
4. Pripipetuj 900 μl čistého etanolu a homogenizuj minimálne jednu minútu.
5. Cetrifuguj 2 minúty pri 13 000 otáčok/min.
6. Odpipetuj supernatant.
7. K sedimentu napipetuj 50 μl 70% mravčej kyseliny a homogenizuj.
8. Nechaj extrahovať 30 minút.
9. Pripipetuj 50 μl 100% acetonitrilu a homogenizuj.
10. Cetrifuguj 2 minúty pri 13 000 otáčok/min.
11. Na vyčistenú MALDI dosku napipetuj 1 μl supernatantu a nechaj vysušiť.
12. Po vysušení vzorky prevrstvi vzorku 1 μl MALDI matrice (CHCA).

8.2 Porovnanie hmotnostných spektier biotypizovaných kvasiniek

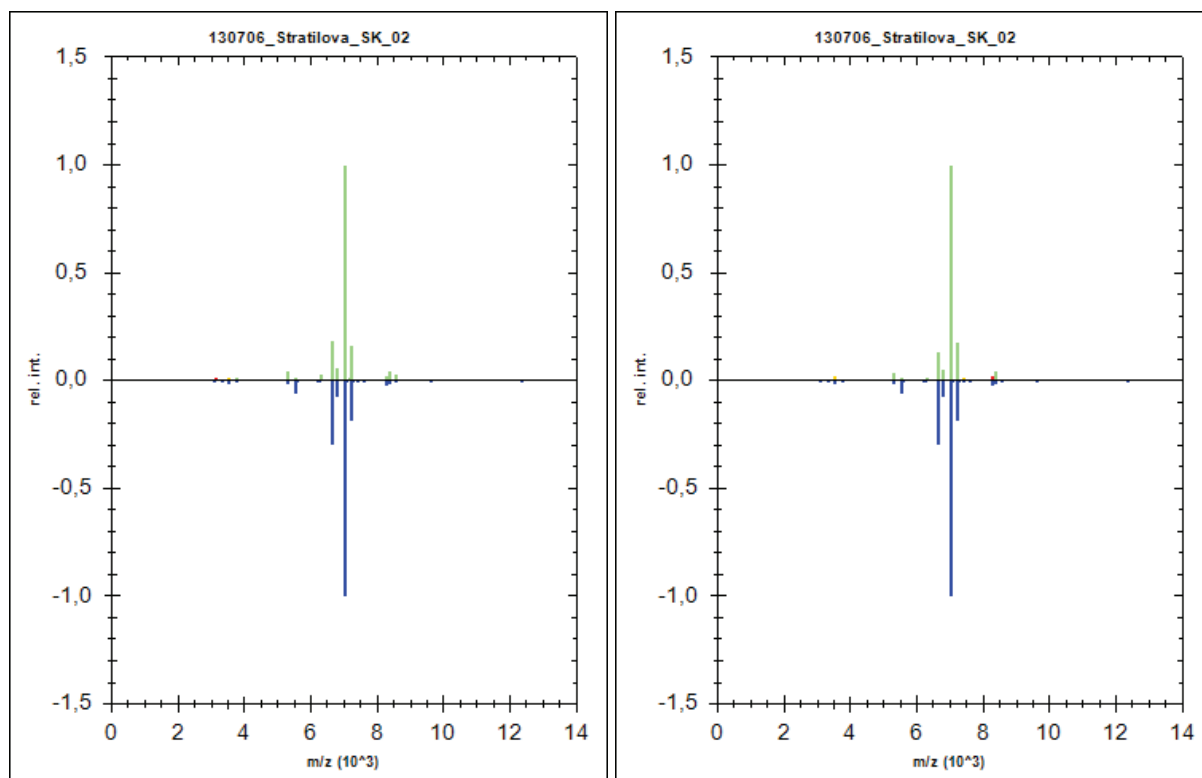
8.2.1 *Cryptococcus laurentii* (skupina II)



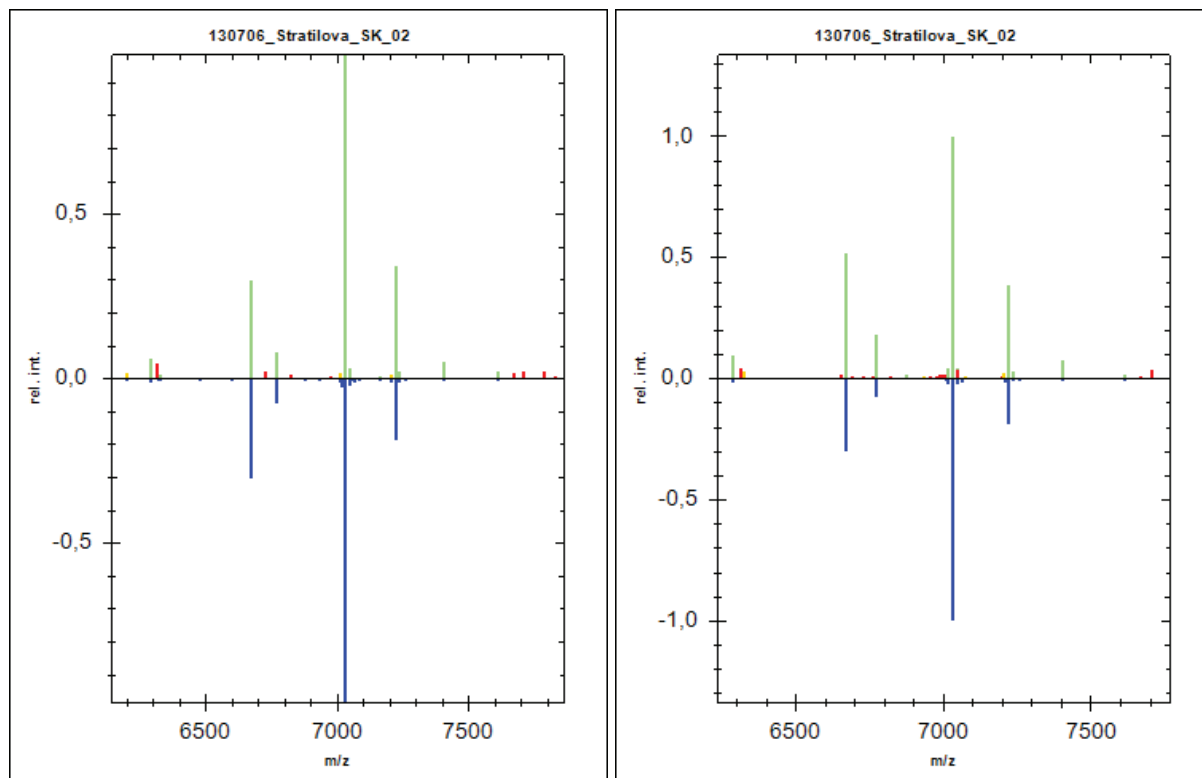
Obr. 25: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-17 vľavo s CCY 17-3-8 (skóre 2,223), vpravo s CCY 17-3-9 (skóre 2,138).



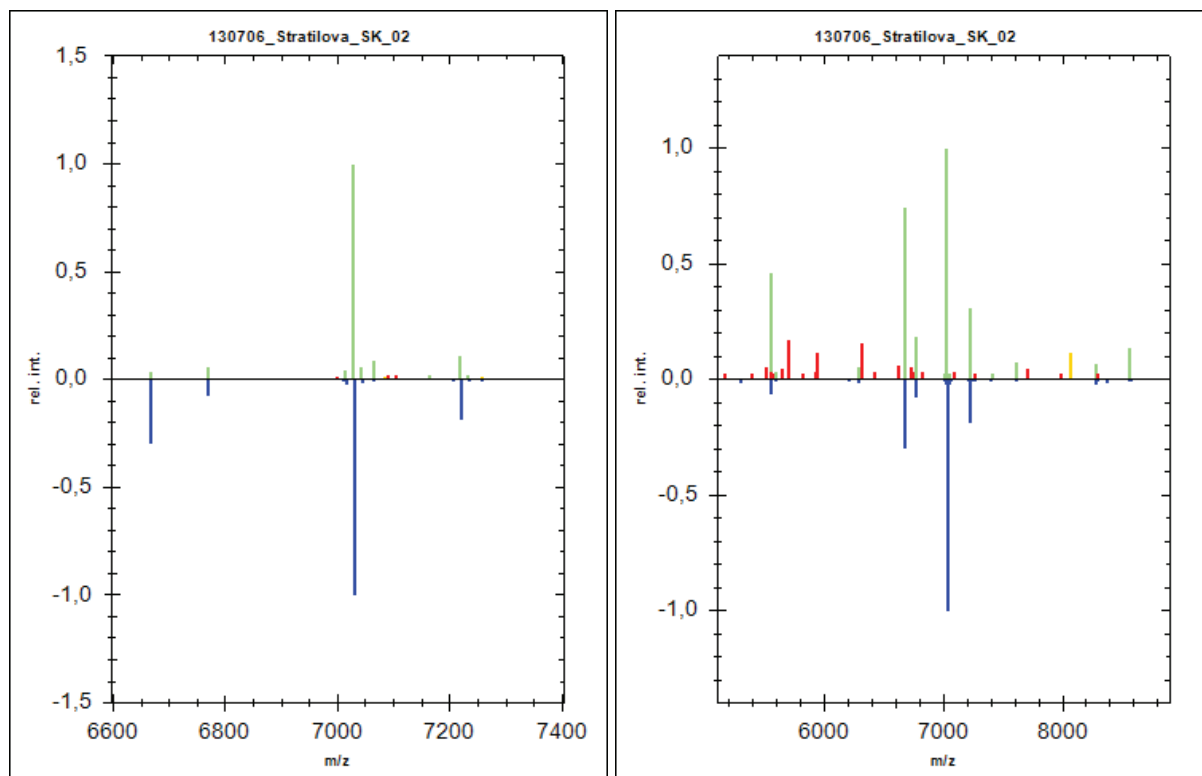
Obr. 26: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-17 vľavo s CCY 17-3-10 (skóre 2,313), vpravo s CCY 17-3-11 (skóre 2,299)



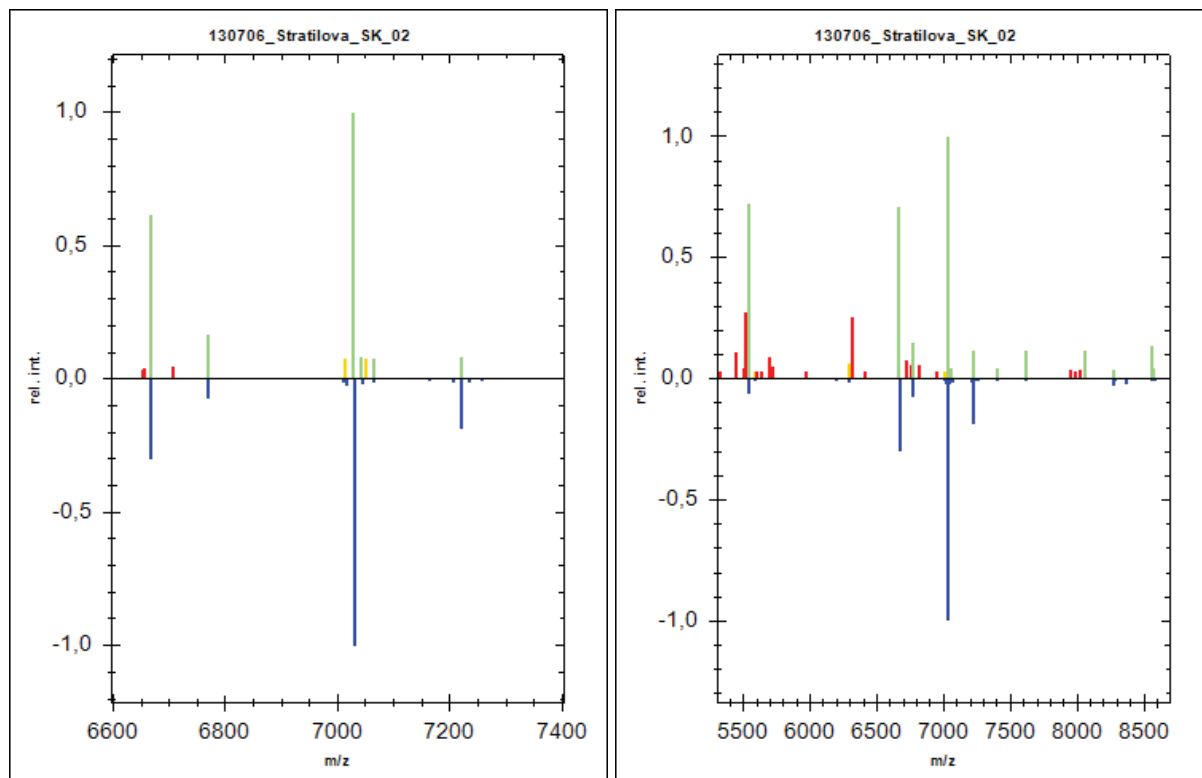
Obr. 27: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-17 vľavo s CCY 17-3-14 (skóre 2,210), vpravo s CCY 17-3-20 (skóre 2,062).



Obr. 28: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-17 vľavo s CCY 17-3-23 (skóre 2,111), vpravo s CCY 17-3-24 (skóre 2,148).

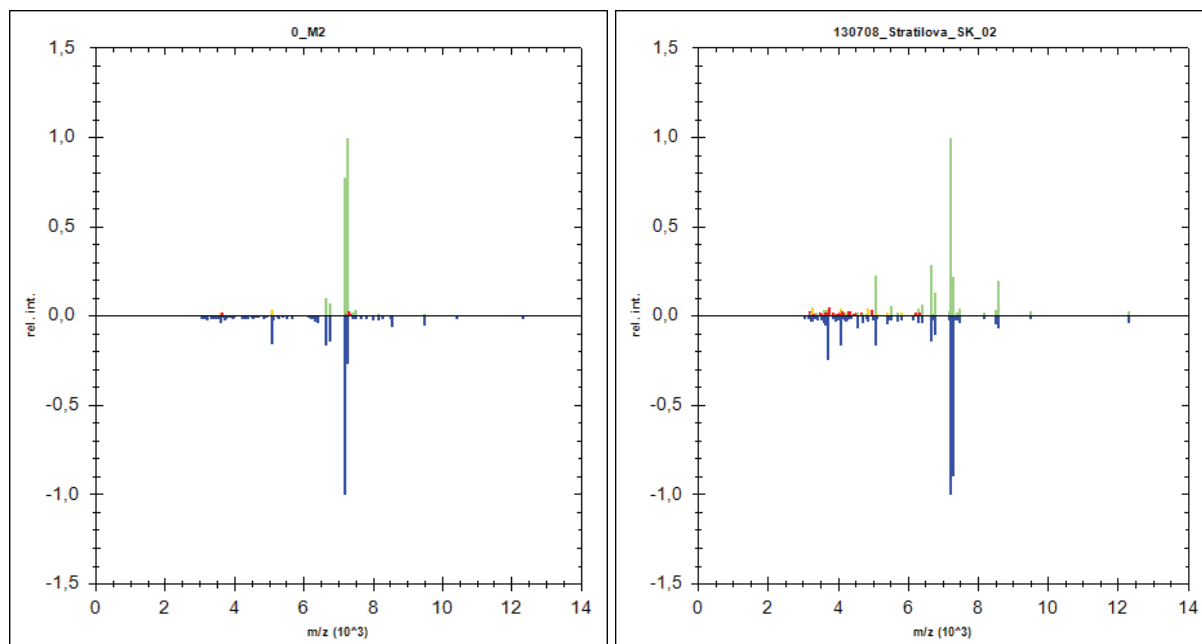


Obr. 29: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-17 vľavo s CCY 17-3-27 (skóre 2,226), vpravo CCY 17-3-22 (skóre 1,774).

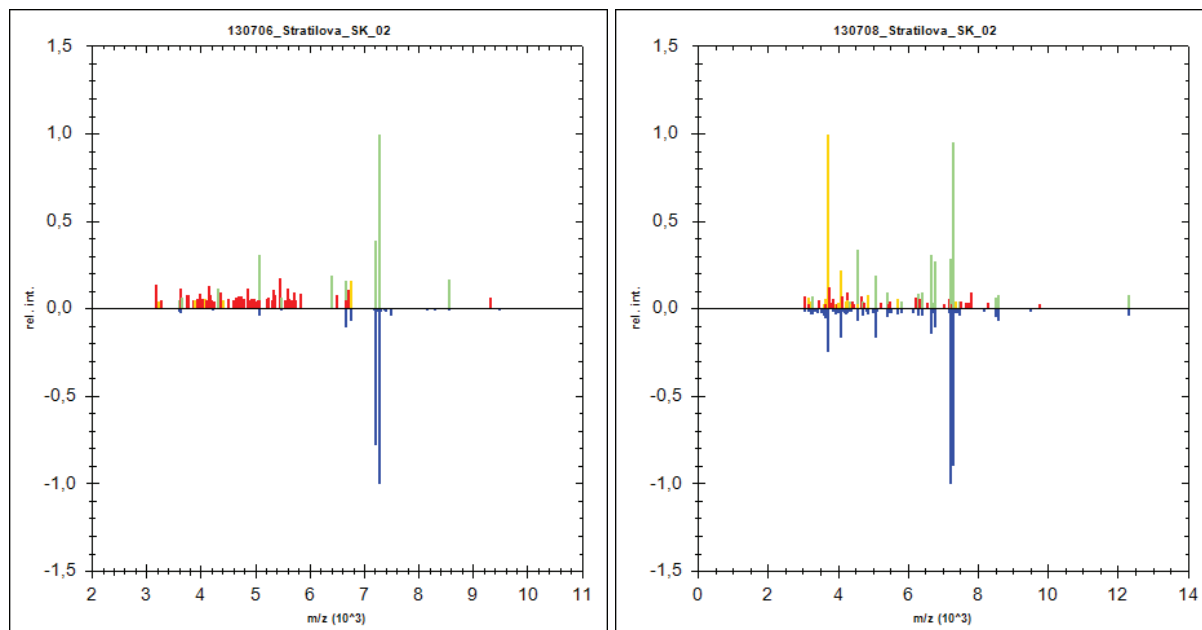


Obr. 30: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-17 vľavo s CCY 17-3-7 (skóre 1,802), vpravo s CCY 17-3-21 (skóre 1,952).

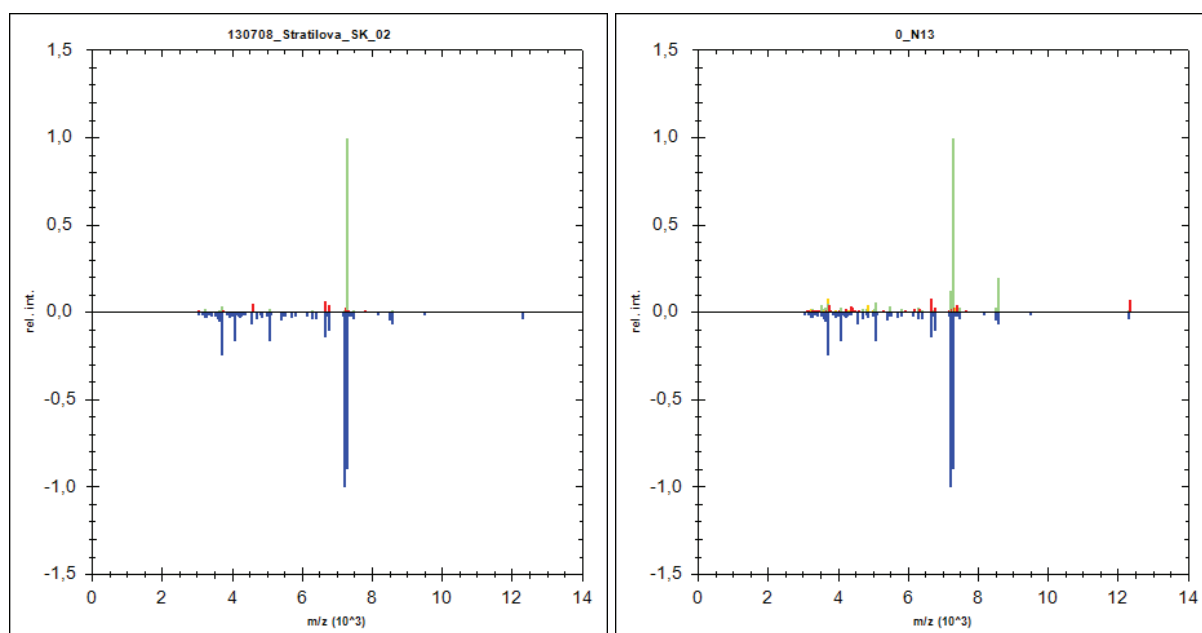
8.2.2 *Cryptococcus flavescens* (skupina III)



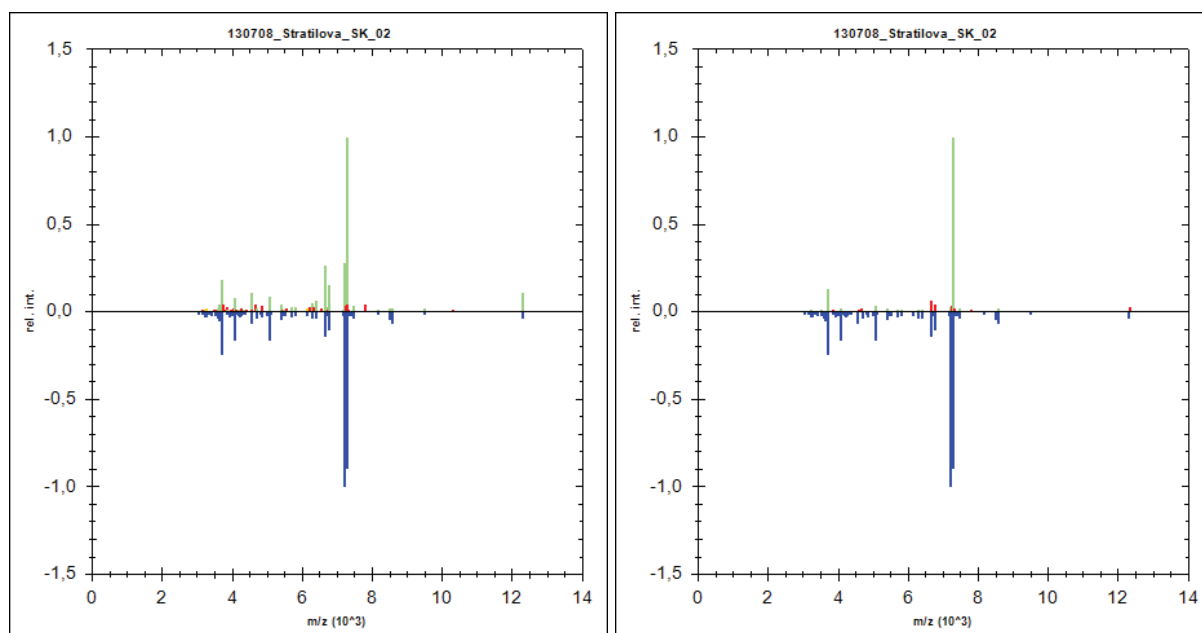
Obr. 31: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-29 vľavo s CCY 17-3-15 (skóre 2,107), vpravo s CCY 17-3-16 (skóre 2,285).



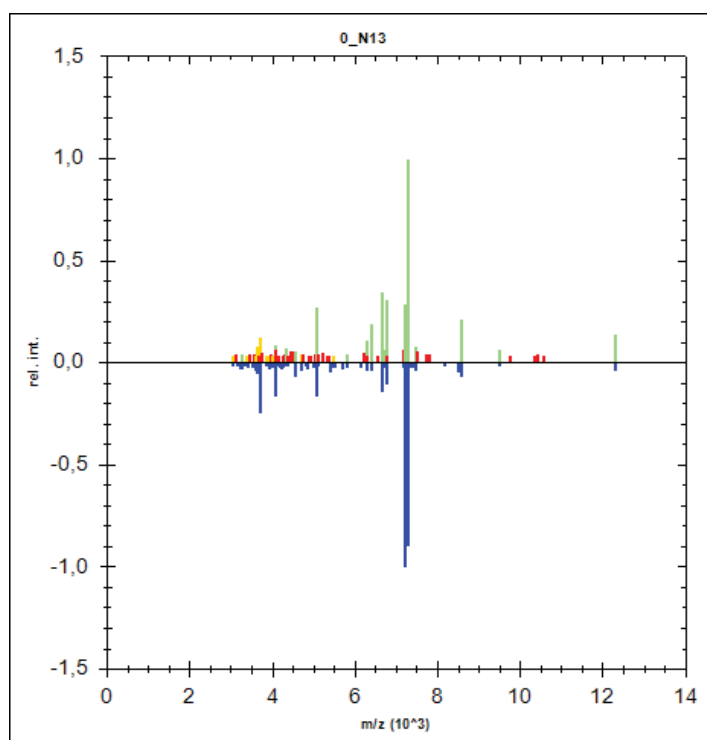
Obr. 32: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-29 vľavo s CCY 17-3-19 (skóre 1,909), vpravo s CCY 17-3-28 (skóre 2,118).



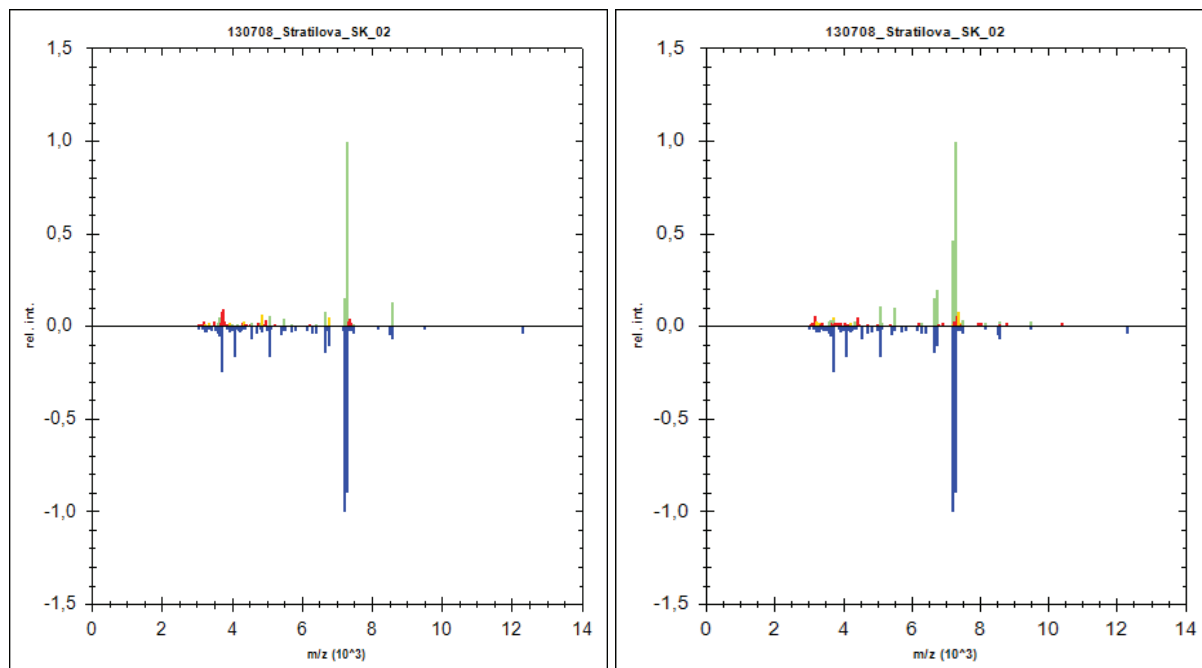
Obr. 33: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-29 vľavo s CCY 17-3-30 (skóre 2,056), vpravo s CCY 17-3-31 (skóre 2,193).



Obr. 34: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-29 vľavo s CCY 17-3-33 (skóre 2,274), vpravo s CCY 17-3-34 (skóre 2,172).



Obr. 35: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-29 s CCY 17-3-38 (skóre 1,945).



Obr. 36: Porovnanie MS spektra CCY 17-3-29 vľavo, vpravo s CCY 17-3-22₁ (skóre 2,091).