

# 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

VLIV KULTIVAČNÍHO MÉDIA NA IDENTIFIKACI KVASINEK RODU  
CRYPTOCOCCUS HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

ALENA JURNEČKOVÁ

BRNO 2015



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

# VLIV KULTIVAČNÍHO MÉDIA NA IDENTIFIKACI KVASINEK RODU CRYPTOCOCCUS HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

EFFECT OF CULTURE MEDIUM ON THE IDENTIFICATION OF YEASTS OF THE GENUS  
CRYPTOCOCCUS USING MASS SPECTROMETRY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ALENA JURNEČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. EVA STRATILOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



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

## Zadání bakalářské práce

|                         |                                        |                                  |
|-------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|
| Číslo bakalářské práce: | <b>FCH-BAK0874/2014</b>                | Akademický rok: <b>2014/2015</b> |
| Ústav:                  | Ústav chemie potravin a biotechnologií |                                  |
| Student(ka):            | <b>Alena Jurnečková</b>                |                                  |
| Studijní program:       | Chemie a technologie potravin (B2901)  |                                  |
| Studijní obor:          | Biotechnologie (2810R001)              |                                  |
| Vedoucí práce:          | <b>Ing. Eva Stratilová, Ph.D.</b>      |                                  |
| Konzultanti:            | doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.        |                                  |

### Název bakalářské práce:

Vliv kultivačního média na identifikaci kvasinek rodu *Cryptococcus* hmotnostní spektrometrií

### Zadání bakalářské práce:

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

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

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

-----  
Alena Jurnečková  
Student(ka)

-----  
Ing. Eva Stratilová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Rod *Cryptococcus* je v oblasti klinické mikrobiologie znám pro svoji obtížnou identifikaci a taxonomické zařazení. Pro tuto bakalářskou práci bylo vybráno celkem 22 kmenů kvasinek rodu *Cryptococcus*. Větší část kmenů byla nejprve sekvenována analýzou D1/D2 domény LSU rRNA genu. Pro kultivaci byly zvoleny tři typy médií – YPD, bramborový a Sabouraudův agar. Vzorky byly upraveny dle normované metody firmy Bruker Daltonik, Chemického ústavu SAV a kombinací těchto dvou metod. Identifikace byla provedena metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Získaná spektra byla porovnána příslušným softwarem a vyhodnocena na základě specifického algoritmu.

Nejvhodnější médium pro kultivaci a tedy biotypizaci s procentuálně nejvyšším skórem bylo YPD (Yeasts pepton dextrose). Naopak nejméně vhodným kultivačním médiem byl Sabouraudův agar (SA), který dosáhl nejmenší procentuální úspěšnosti dle parametrů daných algoritmem firmy Bruker Daltonik.

V případě metod úpravy a aplikace vzorku dosáhla nejvyšší úspěšnosti kombinovaná metoda při použití YPD média.

Výsledkem kompletní analýzy jsou dendrogramy pro jednotlivá média zobrazující genetickou podobnost kmenů kvasinek. Dendrogram znázorňuje zařazení jednotlivých kmenů do příslušných skupin.

Do fylogenetické skupiny *Cr. laurentii* I (označení větve v dendrogramu A) byly správně zařazeny kmeny *Cr. flavescens* (CCY 17-3-28, CCY 17-3-30) a *Cr. laurentii* (CCY 17-3-2). Přestože kmen *Cr. flavus* (CCY 17-3-5) vykazuje podobnost s kmenem *Cr. flavescens*, nepatří do této fylogenetické skupiny.

Do fylogenetické skupiny *Cr. laurentii* II (označení větve B) byly umístěny kmeny *Cr. carnescens* (CCY 17-3-13) a *Cr. victoriae* (CCY 17-3-26). Kmeny *Cr. magnus* (CCY 17-4-39, CCY 17-4-40) se vyznačují podobností s těmito kmeny, ale do fylogenetické skupiny II nepatří.

Kmeny *Cr. gastricus* (CCY 17-5-1) a *Cr. diffluens* (nezařazený) tvoří větev s označením C. *Cr. aerius* (CCY 17-4-9), který byl také do této skupiny zařazen, jsme navrhli na sekvenční analýzu, neboť jeho spektrum spíše naznačuje, že se jedná o kmen *Cr. diffluens*.

Větev dendrogramu, nesoucí označení D, obsahuje kmeny *Bulleromyces albus* (CCY 17-3-35, CCY 17-3-36) a *Cr. saitoi* (CCY 17-3-18, CCY 17-4-2).

Sekvenovaný *Cr. albidus* (CCY 17-4-1), neseekvenovaný *Cr. diffluens* (CCY 17-4-13) a *Cr. terreus* (CCY 17-8-1) se řadí do skupiny označenou písmenem E. Vzhledem k tomu, že sekvenovaný kmen *Cr. diffluens* se vyskytl už ve skupině C, byl kmen CCY 17-4-13 navržen na sekvenční analýzu. Do této skupiny se řadí také sekvenovaný *Cr. aerius* (CCY 17-25-1), který však tvoří samostatnou větev v dendrogramu v rámci skupiny.

Poslední skupinu, označenou písmenem F, tvoří *Cr. macerans* (CCY 17-19-3) a také kontrolní kmeny *Cr. neoformans* var. *neoformans* (CCY 17-1-4, CCY 17-1-5).

## KLÍČOVÁ SLOVA

kultivační médium, biotyping, MALDI-TOF MS, rod *Cryptococcus*

## ABSTRACT

*Cryptococcus* genus is known for its difficult identification and taxonomical classification in area of clinical microbiology. For this bachelor thesis, total 22 yeast strains of the *Cryptococcus* genus were chosen. The part of strains was firstly analyzed by D1/D2 domain LSU rRNA gene analysis. Three types of culture medium – YPD, potato dextrose agar and Sabouraud's medium were selected for cultivation. Samples were prepared according to standardized method of Bruker Daltonik company, Institute of Chemistry of SAS and combination of these two methods. Identification was done by MALDI-TOF mass spectrometry. Obtained spectra were compared using corresponding software and evaluated on the basis of specific algorithm.

The most advantageous culture medium for cultivation and biotyping with the largest percentage score was YPD (Yeasts pepton dextrose). On the other hand, the least advantageous culture medium was Sabouraud's agar, which reached the smallest percentage success due to parameters of Bruker Daltonik algorithm.

The most successful method of sample preparation and application was the combined method with YPD as a culture medium.

The results of complete analysis are dendrograms for each medium showing the genetic similarity of yeast strains. The dendrogram shows categorization of the single strains into appropriate groups.

*Cr. flavescens* (CCY 17-3-28, CCY 17-3-30) and *Cr. laurentii* (CCY 17-3-2) strains were correctly integrated into phylogenetic group *Cr. laurentii* I (branch in the dendrogram with designation A). *Cr. flavus* (CCY 17-3-5) doesn't belong to this group, although it shows similarity with *Cr. flavescens*.

The strains *Cr. carnescens* (CCY 17-3-13) and *Cr. victoriae* (CCY 17-3-26) belong to the phylogenetic group *Cr. laurentii* II (designated as B). *Cr. magnus* (CCY 17-4-39, CCY 17-4-40) strains show similarity with these strains, but doesn't belong to the phylogenetic group II.

The strains *Cr. gastricus* (CCY 17-5-1) and *Cr. diffluens* (non-attached) form a branch designated as C. *Cr. aerius* (CCY 17-4-9) strain, which was also put into this group, was proposed to sequence analysis, because its spectrum indicates that it should be rather a *Cr. diffluens* strain.

The group D contains *Bulleromyces albus* (CCY 17-3-35, CCY 17-3-36) and *Cr. saitoi* (CCY 17-3-18, CCY 17-4-2) strains.

The sequenced *Cr. albidus* (CCY 17-4-1), non-sequenced *Cr. diffluens* (CCY 17-4-13) and *Cr. terreus* (CCY 17-8-1) form the group E. The strain CCY 17-4-13 was proposed to sequence analysis because of occurrence of the *Cr. diffluens* sequenced strain in the group C. The sequenced *Cr. aerius* (CCY 17-25-1) is also part of this group, but it represents a separate branch.

The last group is named as F and consists of *Cr. macerans* (CCY 17-19-3) and control strains *Cr. neoformans* var. *neoformans* (CCY 17-1-4, CCY 17-1-5).

## KEY WORDS

culture medium, biotyping, MALDI-TOF MS, genus *Cryptococcus*

JURNEČKOVÁ, A. *Vliv kultivačního média na identifikaci kvasinek rodu Cryptococcus hmotnostní spektrometrií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 59 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Stratilová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce paní Ing. Evě Stratilové, Ph.D., paní doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc., Barboře Stratilové a celému kolektivu Chemického ústavu Slovenské akademie věd v Bratislavě za jejich pomoc, ochotu a cenné rady při řešení mé bakalářské práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům za obětavou podporu a pochopení při mém studiu.

# OBSAH

|       |                                                                      |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | ÚVOD .....                                                           | 8  |
| 2     | TEORETICKÁ ČÁST .....                                                | 9  |
| 2.1   | Kvasinky .....                                                       | 9  |
| 2.1.1 | Obecná charakteristika kvasinek .....                                | 9  |
| 2.1.2 | Morfologie kvasinek .....                                            | 10 |
| 2.1.3 | Cytologie kvasinek .....                                             | 10 |
| 2.2   | Rod <i>Cryptococcus</i> .....                                        | 16 |
| 2.2.1 | Fylogenetické zařazení rodu <i>Cryptococcus</i> .....                | 16 |
| 2.2.2 | Obecná charakteristika rodu <i>Cryptococcus</i> .....                | 16 |
| 2.2.3 | Vybrané druhy rodu <i>Cryptococcus</i> .....                         | 17 |
| 2.3   | Hmotnostní spektrometrie .....                                       | 28 |
| 2.3.1 | Instrumentace .....                                                  | 28 |
| 2.3.2 | Ionizace .....                                                       | 29 |
| 2.3.3 | Vakuový systém .....                                                 | 32 |
| 2.3.4 | Hmotnostní analyzátory .....                                         | 32 |
| 2.3.5 | Detektory .....                                                      | 34 |
| 2.4   | Identifikace mikroorganismů MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií ..... | 34 |
| 3     | CÍL PRÁCE .....                                                      | 36 |
| 4     | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....                                            | 37 |
| 4.1   | Seznam použitých kmenů kvasinek rodu <i>Cryptococcus</i> .....       | 37 |
| 4.2   | Použité přístroje a chemikálie .....                                 | 37 |
| 4.2.1 | Použité přístroje a příslušenství .....                              | 37 |
| 4.2.2 | Použité chemikálie .....                                             | 38 |
| 4.3   | Příprava kultivačních médií .....                                    | 38 |
| 4.3.1 | Příprava bramborového agaru (ZA) .....                               | 38 |
| 4.3.2 | Příprava YPD média (Yeast pepton dextrose) .....                     | 39 |
| 4.3.3 | Příprava Sabouraudova agaru (SA) .....                               | 39 |
| 4.4   | Inokulace kvasinek rodu <i>Cryptococcus</i> .....                    | 39 |
| 4.5   | Kultivace kvasinek rodu <i>Cryptococcus</i> .....                    | 39 |
| 4.6   | Příprava matric pro MALDI-TOF MS .....                               | 39 |
| 4.6.1 | Příprava matrice č. 1 (CHCA) .....                                   | 39 |

|       |                                                                                                                                          |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.6.2 | Příprava matrice č. 2 (SAFA).....                                                                                                        | 40 |
| 4.7   | Metody přípravy a aplikace vzorku na MALDI-TOF desku .....                                                                               | 40 |
| 4.7.1 | Metoda přípravy a aplikace vzorku dle firmy Bruker (Metoda č. 1, EtOH-CHCA) .....                                                        | 40 |
| 4.7.2 | Kombinovaná metoda přípravy a aplikace vzorku (Metoda č. 2, EtOH-SAFA).....                                                              | 40 |
| 4.7.3 | Metoda přípravy a aplikace vzorku vypracovaná pro rod <i>Cryptococcus</i> rostoucí na sladidě (Metoda č. 3, H <sub>2</sub> O-SAFA) ..... | 40 |
| 4.8   | Analýza proteinů MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií .....                                                                                | 41 |
| 4.9   | Kalibrace zařízení .....                                                                                                                 | 42 |
| 4.10  | Měření na zařízení MALDI TOF/TOF .....                                                                                                   | 42 |
| 4.11  | Software pro vyhodnocení naměřených dat .....                                                                                            | 42 |
| 4.12  | Sekvenční analýza D1/D2 domén LSU rRNA genu .....                                                                                        | 43 |
| 5     | VÝSLEDKY A DISKUSE .....                                                                                                                 | 44 |
| 5.1   | Vyhodnocení hmotnostních spekter kvasinek rodu <i>Cryptococcus</i> .....                                                                 | 44 |
| 5.2   | Vliv kultivačního média, metody a aplikace vzorku na kvalitu hmotnostních spekter kvasinek.....                                          | 45 |
| 5.3   | Vyhodnocení podobnosti kvasinek na základě hmotnostních spekter .....                                                                    | 50 |
| 6     | ZÁVĚR .....                                                                                                                              | 53 |
| 7     | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....                                                                                                          | 54 |
| 8     | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....                                                                                                 | 58 |

# 1 ÚVOD

Kvasinky rodu *Cryptococcus* jsou známe především jako původci onemocnění zvaného kryptokokóza. Vzhledem k narůstajícímu výskytu této nemoci, vzrůstají i nároky na úspěšnou a rychlou identifikaci jednotlivých kmenů, neboť typ účinného léčiva závisí od druhu případně až variety mikroorganismu.

Identifikace a následné taxonomické zařazení kmene je však poměrně komplikované. Mnohdy byly druhy chybně označeny, v některých případech ani nebyly identifikovány. Jedním z důvodů tohoto neúspěchu je tvorba silnostěnné polysacharidové kapsule a extracelulárních polysacharidů, které jsou typické pro celý rod *Cryptococcus*, především pro druhy *Cryptococcus neoformans* a *Cryptococcus gatti*.

Rutinní metody používané v laboratořích stanovují mikroorganismy na základě jejich fyziologických, morfologických a biochemických vlastností anebo na základě sekvencí genomu. Molekulární techniky např. real-time PCR, analýza sekvence DNA, microarray analýza nebo fluorescenční *in-situ* hybridizace dosahují vysoké procentuální úspěšnosti, avšak jsou časově i finančně náročné. A tak se jako mnohem levnější a rychlejší alternativa osvědčila metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, která je založena na stanovení ribozomálních proteinů vyextrahovaných z buněk mikroorganismů a následném porovnání naměřených a referenčních hmotnostních spekter z dostupných knihoven. V případě rodu *Cryptococcus* může být vzhled naměřených spekter narušený přítomností extracelulárních polysacharidů nebo fragmentů kapsule. Z tohoto důvodu se kladou zvýšené nároky na přípravu vzorků a podmínky jejich měření.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kvasinky

#### 2.1.1 Obecná charakteristika kvasinek

Označení „kvasinky“ pochází původně z holandského slova *gist*, které představuje fermentující houbu (pěnu) v pivovarském průmyslu. Francouzský termín *levure* vyjadřuje spojitost kvasinek s procesem kynutí těsta na výrobu chleba. První koncept charakteristiky kvasinek pochází z 19. století, kdy byla nejvíce známa kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* a její důležitá role při alkoholovém kvašení a kynutí těsta [1].

Podle Boekhouta a Kurtzmana jsou kvasinky askomycetní nebo bazidiomycetní houby, které se vegetativně rozmnožují pučením nebo dělením buněk a tvoří také sexuální formy. Jedná se tedy o heterotrofní, jednobuněčné a eukaryotní mikroorganismy, které patří do říše houby (Fungi). Jelikož postrádají chlorofyl, nemohou realizovat proces fotosyntézy a jsou tedy striktně chemoorganotrofní. Pro růst kvasinek je nezbytný uhlík vázaný v organických sloučeninách, jako jsou např. jednoduché sacharidy, organické a mastné kyseliny, alifatické alkoholy nebo heterocyklické sloučeniny [2], [3].

Výskyt kvasinek není nikterak omezen, prakticky je lze nalézt na celém světě. Mnoho kmenů kvasinek bylo izolováno z rostlin a zvířat, kde jsou součástí např. intestinálního traktu nebo kůže teplokrevných živočichů a mohou působit i jako patogenní mikroorganismy. Velmi často se kvasinky vyskytují také v půdě, vodě, vzduchu a v extrémních podmínkách např. v ledu na Antarktidě. Kvasinky jsou též původci mnoha onemocnění u člověka. Jedna z nejčastějších chorob je kandidóza způsobená zástupcem rodu *Candida* – *Candida albicans*. Tato nemoc postihuje především kůži, ústní dutinu nebo pohlavní orgány. Nejznámější zástupce rodu *Cryptococcus* – *Cryptococcus neoformans* je hlavní původce tzv. kryptokokózy, která způsobuje infekci dýchací soustavy nebo centrálního nervového systému. Kromě kryptokokózy je *Cr. neoformans* spojován také s meningitidou a infekcemi týkajícími se kůže, kostí a kloubů. Některé druhy rodu *Rhodotorula* jsou původci septikemie, meningitidy a peritonitidy. Rod *Saccharomyces* způsobuje infekce dutiny ústní nebo pohlavních orgánů pouze vzácně. Zástupci rodu *Trichosporon* jsou známi jako původci infekcí kůže a vlasů [2], [4].

Kromě vegetativního rozmnožování (pučení) je u kvasinek znám také pohlavní způsob rozmnožování. Kvasinky, tvořící pohlavní spory zvané askospory, které jsou umístěny ve vřecku (asku), se řadí do pododdělení *Ascomycotina*. Některé rody kvasinek tvoří pohlavní exospory, tedy spory umístěné vně sporotvorných buněk (bazidiospory). Tyto rody se řadí do pododdělení *Basidiomycotina*. Třetí pododdělení *Deuteromycotina* nevykazuje sexuální reprodukci (anamorfní formy) [1], [3], [5].

Kvasinky tvoří tzv. teleomorfní a anamorfní formy, které se odlišují produkcí pohlavních spor. Teleomorfní formy jsou charakteristické tvorbou těchto spor, zatímco anamorfní formy nikoliv. Důvodem, proč anamorfní formy neprodukují pohlavní spory, je pravděpodobně nevhodné kultivační prostředí nebo nedostačující kombinace kmenů při

páření. Nejznámější představitel rodu *Cryptococcus* je *Cryptococcus neoformans*, který je anamorfní formou *Filobasidiella neoformans* [1], [6].

### 2.1.2 Morfologie kvasinek

Buňky kvasinek nelze pozorovat pouhým okem, ale pouze pod mikroskopem, neboť dosahují velikosti v rozmezí od 2–3  $\mu\text{m}$  do 20–50  $\mu\text{m}$  délky a 1–10  $\mu\text{m}$  šířky. Kvasinky rostoucí na agaru se liší nejen z hlediska tvaru, ale také charakteru povrchu, v barvě, geometrii kolonií atd. Mohou nabývat různých tvarů, které se odvíjí i od způsobu vegetativního rozmnožování. Tvar buněk se může měnit v závislosti na podmínkách vnějšího prostředí, stáří buňky a je blízce spojen s aktuální funkcí buňky [3], [7], [8].

Nejčastěji je tvar kulovitý, elipsoidní, případně vejčitý. Některé rody tvoří také dlouze protáhlé buňky. Objevují se však i tvary citronovité, ogivální, lahvovité nebo vláknité. Kulovitý tvar se projevuje u buněk, které rostou dlouhou dobu na jednom médiu nebo na médiu s převahou minerálních látek. Protáhlý tvar buněk se může projevit v médiu s nadměrným množstvím kyslíku, naproti tomu vláknitý tvar může být způsoben zpomaleným dělením buněk, nedostatkem živin a kyslíku [3], [8].

Pro většinu kvasinek je charakteristické rozmnožování pučením, tzn., že na mateřské buňce se postupně tvoří pupen a jakmile dojde k fragmentaci veškerých buněčných organel, pupen se může oddělit do mateřské buňky. Podle místa, kde pupen na povrchu buňky vzniká, lze rozlišit pučení monopolární, bipolární a multipolární. Pro kvasinky rozmnožující se monopolárním pučením je typické, že se pupen tvoří vždy na stejném pólu protáhlé buňky. Tvar těchto kvasinek je pak především ogivální. Bipolárně pučící kvasinky, u kterých vznikají pupeny na obou pólech buňky, mají tvar citronovitý. U multipolárně pučících kvasinek pupen vzniká na jakémkoliv místě buňky, nikdy však na tom samém místě. Pupeny rostoucí na pólech buňky některých rodů nebo druhů kvasinek se neoddělují od mateřské buňky a tvoří tak dlouhá zaškrcovaná vlákna zvaná pseudomycelium. V určitých místech pseudomycelia vznikají svazky kratších elipsoidních buněk tzv. blastospor. Buňky v hýfách pravého mycelia se rozmnožují příčným dělením a průřez hýfy je po celé délce konstantní, zatímco vlákno pseudomycelia je zaškrcené. V pravém myceliu se vyskytují podobné svazky blastospor nazývané jako blastokonidie [6].

Některé druhy tvoří jednobuněčné exospory přichycené na tenkých stopkách zvaných sterigmata. Zralé spory jsou pak odmrštěny od stopek zvláštním mechanismem a nazývají se balistospor. Různých tvarů nabývají i haploidní spory, vznikající při sporulaci diploidních buněk v rámci pohlavního rozmnožování kvasinek [3], [5].

### 2.1.3 Cytologie kvasinek

#### 2.1.3.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna hraje klíčovou roli v udržení tzv. vnitrobuněčného tlaku (turgor) a zachování tvaru buňky. Chrání buňky před poškozením, degradací cizorodými proteiny a dehydratací. Buněčná stěna umožňuje adhezi buněk a jejich rozpoznávání mezi sebou. Přes

póry buněčné stěny mohou volně procházet všechny sloučeniny, výjimkou jsou však vysokomolekulární látky jako bílkoviny a polysacharidy [3], [6].

Základními složkami buněčné stěny jsou sacharidové jednotky – manany a glukany ( $\beta$ -1,3-glukan), patřící do skupiny homopolysacharidů. Dále jsou obsaženy heteropolysacharidy – galaktomanan, fukomanan, xylomanan a u některých druhů se objevuje také glukosamin a chitin. Obvykle jsou polysacharidy buněčné stěny neutrální, avšak některé rody obsahují také kyselé komponenty – uronové kyseliny nebo kyselinu fosforečnou. Tyto polysacharidy lze najít např. u rodu *Cryptococcus* nebo *Lipomyces*. Polysacharidy představují až 80 % sušiny a mají strukturu vláken tvořících pevnou spleť, vyplněnou proteiny [3], [6].

Minoritní složku buněčné stěny představují lipidy a fosfolipidy (3 až 10 %), dále fosforečnany, které se esterovou vazbou vážou k polysacharidům. Tyto fosfátové zbytky spolu s karboxylovými skupinami proteinů dávají buňkám negativní náboj, který ovlivňuje adsorpci látek ze živného prostředí např. barviv [3].

Složení buněčné stěny však nemusí být vždy konstantní. V případě kvasinky *S. cerevisiae* je tloušťka, složení a struktura buněčné stěny závislá na pH, teplotě, zdroji uhlíku a dostupnosti živin. Buněčná stěna askomycet se skládá ze dvou vrstev – vnitřní (transparentní) a vnější, složené z dlouhých fibril. Vnitřní vrstva svým tvarem koresponduje s vrstvou skeletu a z hlediska složení převažují dlouhé řetězce polysacharidů, zatímco v případě vnější vrstvy jsou to glykoproteiny vázané kovalentní vazbou k vnitřní vrstvě skeletu. V případě bazidiomycet se může buněčná stěna skládat ze dvou, tří nebo i více vrstev. U druhu *Cryptococcus neoformans* je buněčná stěna třívrstvá, obklopená kapsulí, která má charakter porézní sítě mnohdy větších rozměrů než samotná buňka kvasinky. Buněčná stěna je složena z chitinu,  $\alpha$ -1,3-glukanu a  $\beta$ -1,6-glukanu. Překvapivě zde není přítomen  $\beta$ -1,3-glukan. Kapsule je složena z  $\alpha$ -1,3-glukanu, polysacharidu GXMan (glukuronoxylomanan) a MXGal (galaktoxylomanan) [6].

### 2.1.3.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána označovaná jako plazmalema, je poměrně tenká membrána (7,5–8 nm) tvořící osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím. Je složena z lipidů a proteinů a je volně propustná pouze pro částice bez náboje. Mezi hlavní funkce plazmalemy patří tvorba elastické vrstvy chránící spolu s buněčnou stěnou povrch buňky, kontrola příjmu a exportu látek do i ven z buňky a je také místem, kde se odehrává biosyntéza některých složek buněčné stěny. Buňka bez buněčné stěny a kapsulí, obklopená pouze cytoplazmatickou membránou, se nazývá protoplast. Charakteristickým znakem cytoplazmatické membrány je tvorba vychlípenin (invaginace). Tyto výčnělky se mohou rozšiřovat do nitra buňky a postupně se z nich mohou odštěpovat vezikuly (transportní váčky) nebo tubuly. Významnou vlastností cytoplazmatické membrány je také viskozita. Hraje totiž důležitou roli v transportních systémech, enzymové aktivitě a difúzi proteinů. [3], [8].

Plazmalema obsahuje několik hydrolytických enzymů a enzymů spojených se syntézou složek buněčné stěny. Jedním z nejvýznamnějších je ATPáza (adenosintrifosfátaza), která katalyzuje přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na adenosindifosfát (ADP) [9].

Cytoplazmatická membrána se chová jako selektivní bariéra z hlediska transportu látek. Prakticky existují tři možnosti přenosu látek přes plazmalemu – volná difúze, usnadněná difúze a aktivní transport [8].

### **2.1.3.3 Cytoplazma**

Cytoplazma, nazývaná též jako cytosol, má u mladých buněk charakter průhledné homogenní hmoty, zatímco u starších buněk se již objevují při pozorování světelným mikroskopem četná zrníčka a jemná nebo větší vakuolizace. Obecně lze cytoplazmu považovat za vodný roztok, pokud však separujeme organely centrifugací, získáme koloidní roztok, jehož koloidní charakter je způsoben především přítomností rozpuštěných proteinů (10 až 50 %) [3], [9].

Mezi další látky přítomné v cytosolu patří ribonukleové kyseliny, lipidy (2 až 3 %), sacharidy (1 %), anorganické ionty a meziprodukty metabolických drah umístěných v cytoplazmě. Významnou roli mají také tlumivé roztoky (pufrы) zajišťující konstantní hodnotu pH 6,2–6,4 a membránové útvary zvané peroxizomy obsahující enzymy (peroxidázy, katalázy), které rozkládají pro buňku toxický peroxid vodíku a superoxid, které vznikají při oxidačních reakcích v peroxizomech [8], [9].

### **2.1.3.4 Vakuola**

Vakuola významně ovlivňuje pH a osmo-regulaci buňky. Funguje jako skladovací prostor pro aminokyseliny, ionty a polyfosfáty. Velikost a počet vakuol je různý pro každou buňku. Obvykle buňka obsahuje jednu velkou vakuolu a několik dalších vakuol menších rozměrů. Vnitřní prostor vakuoly (lumen) je obklopen membránou nazývanou tonoplast [6], [8].

Vakuola slouží především jako třídící centrum poškozeného nebo nadbytečného buněčného obsahu při procesu autofagie. Tento děj je součástí regulačních mechanismů mnoha organel, např. peroxizomů, kde je konkrétně nazýván jako pexofagie. Obecně se na autofagii podílí proteiny označené Atg a geny ATG (*Autophagy gene*). Celý proces pak iniciují signální proteiny především proteinkinázy a fosfatázy. Během makroautofagie se formují útvary s dvojitou membránou tzv. autofagozomy, které pohlcují část cytoplazmy. Následně se vnitřní membrána autofagozomu sloučí s vakuolou, čímž vyloučí svůj obsah do vnitřního prostoru vakuoly, kde následně probíhá degradace pomocí hydroláz. V případě mikroautofagie rozšířené úseky vakuoly pohltí část cytoplazmy, která je přímo dopravena do vakuoly. Autofagie má pro buňky velmi důležitý význam. Může ji chránit proti infekcím, ale naopak také může přispět k jejímu poškození [6], [10].

### **2.1.3.5 Endoplazmatické retikulum**

Endoplazmatické retikulum je komplexní síť membránových struktur (cisterny, kanálky) zčásti splývající s vnější jadernou membránou. Obvykle je lokalizováno v blízkosti spodní strany cytoplazmatické membrány (periferie buňky). Základ struktury tvoří dvě membrány obklopující vnitřní tekutinu tzv. enchylemu [6], [8].

Část endoplazmatického retikula v blízkosti jádra je pokryta ribozomy a nazývá se jako granulární neboli drsné ER. Probíhá v něm syntéza membránových lipidů a sekrečních proteinů, které jsou vylučovány z buňky. Naproti tomu agranulární neboli hladké ER neobsahuje na povrchu ribozomy a je tvořeno kanálky s malými váčky. Podílí se na produkci lipidů a na úpravě a transportu bílkovin syntetizovaných v drsném ER. Ve vnitřním obsahu ER dochází k akumulaci peptidů, které slouží pro syntézu proteinů [8], [9].

#### **2.1.3.6 Golgiho komplex**

Golgiho komplex (útvár, aparát) je membránový systém složený ze zploštělých váček naplněných kapalinou. Tyto membránové útvary se označují jako cisterny. Jako první objevil tento aparát v roce 1898 lékař C. Golgi. Jedná se o několik membránových systémů obvykle spojených s endoplazmatickým retikulem, které od ER přejímají produkty prostřednictvím sekrečních váček (vezikuly). Tyto váčky se pohybují cytoplazmou a splývají s cytoplazmatickou membránou, čímž dochází k vyloučení obsahu váčku z buňky. Tento proces se nazývá exocytóza [9].

#### **2.1.3.7 Ribozomy**

Ribozomy hrají velmi důležitou roli v katalýze procesu translace všech druhů mRNA. Jedná se o nejvíce komplexní a propracovanou jednotku v buňce. U eukaryot je přítomno přibližně 0,5 milionu ribozomů v každé buňce a tvoří tak vysoké procento suché buněčné hmoty (25 ž 30 %). Z hlediska struktury disponuje dvěma podjednotkami – malá a velká, jejichž základ tvoří čtyři druhy RNA a 79 ribozomálních proteinů (RPs). Ribozomy eukaryotické a prokaryotické buňky se liší ve své velikosti a sedimentačním koeficientu. Ribozomy u eukaryot dosahují větší velikosti a jejich sedimentační koeficient je 80S (pro větší podjednotku 60S a pro menší 40S) [9], [11].

Ribozomální podjednotky se tvoří v jádře, když se nově transkribované a upravené molekuly rRNA spojují s ribozomálními proteiny, které jsou transportovány po syntéze v cytoplazmě do jádra. Následně jsou vytvořené podjednotky exportovány do cytoplazmy, kde se spojí a jsou tak schopné syntetizovat protein. Malá podjednotka funguje jako nosná konstrukce, na které je rRNA přesně připojována ke kodonům mRNA. Velká podjednotka katalyzuje tvorbu peptidických vazeb, které zajišťují propojení aminokyselin mezi sebou na polypeptidovém řetězci. Malá podjednotka obsahuje 30 různých bílkovin a molekulu 18S rRNA. Velká podjednotka disponuje 40 různými bílkovinami, molekulou 5S rRNA, 28S rRNA a 5,8S rRNA. Každý ribozom obsahuje celkem čtyři vazebná místa – jedno pro mRNA, zbývající tři pro tRNA (A-, P-, E- místo). Pokud však nedochází k tvorbě proteinů, jsou obě podjednotky oddělené [9], [12].

### **2.1.3.8 Mitochondrie**

Mitochondrie jsou organely obklopené dvojitou membránou a složené ze čtyř odlišných prostorů – vnější membrána, vnitřní membrána, mezimembránová oblast a matrix. Obě membrány jsou tvořeny lipoproteiny (65 % proteinů, 35 % lipidů) a strukturálními proteiny. V buňkách kvasinek tvoří mitochondrie dynamický tubulární systém, který mění svůj tvar a pohybuje se po celé délce buňky. Mitochondrie obsahují též ribozomy (mitoribozomy), které se nachází v matrix. Povrch vnitřní membrány je mnohokrát zvětšen díky záhybům zvaným kristy. Z hlediska propustnosti látek je vnitřní membrána semipermeabilní a umožňuje vznik pH gradientu a membránového potenciálu. Vnější membrána má hladký povrch a obsahuje poriny, které zajišťují propustnost pouze pro molekuly o molekulové hmotnosti vyšší než 10 kDa [6], [8].

Mitochondrie mohou nabývat různých tvarů např. kulovitých, válcovitých nebo vláknitých. Dosahují šířky 0,3 až 1  $\mu\text{m}$  a délky až 3  $\mu\text{m}$ . Počet a tvar mitochondrií v buňce závisí na kultivačních podmínkách a stáří buněk. Největší počet lze pozorovat při aerobní kultivaci na nezkvasitelných substrátech, naopak za anaerobních podmínek se mitochondrie zmenšují, takže jsou velmi těžko pozorovatelné. Obecně jsou mitochondrie sídlem enzymů dýchacího řetězce a systému oxidační fosforylace. Jsou tedy zodpovědné za produkci velkého množství ATP (adenosintrifosfát) při aerobním růstu eukaryotických buněk. Syntéza ATP vychází z oxidace uhlíkových zdrojů, jako jsou mastné kyseliny a sacharidy. Finální fáze této oxidace probíhá právě v mitochondriální matrix a je katalyzována enzymy Krebsova cyklu. Redukované kofaktory NADH a  $\text{FADH}_2$  jsou odpovědné za tvorbu membránového potenciálu na vnitřní membráně, který je nezbytný pro produkci ATP procesem oxidační fosforylace [3], [6].

Na rozdíl od ostatních buněčných organel disponují mitochondrie vlastní tzv. mitochondriální DNA umožňující kódování části mitochondriálních proteinů. Zbývající proteiny jsou kódovány jadernými geny, které byly syntetizovány v cytosolu a posléze importovány do organely [6].

### **2.1.3.9 Cytoskelet**

Cytoskelet je tvořen sítí proteinových vláken umístěných v jádře a cytoplazmě, kde umožňuje pohyb organel z jednoho místa na druhé. Hlavními komponenty cytoskeletu kvasinek jsou filamenta složená z aktinu a tubulinu. Oba typy filament jsou tvořeny jednotkami proteinů spojené nekovalentní vazbou. Aktinová vlákna jsou pružná, nevětvená polymery globulárních aktinových podjednotek, které tvoří dvouvláknové helikální struktury. Mikrotubuly vytváří dutá, nevětvená vlákna složená z tubulinových podjednotek. Každá molekula tubulinu obsahuje GTP (guanosintrifosfát), který je zdrojem energie pro její zapojení do mikrotubulu. Aktinová vlákna i mikrotubuly mají dynamický charakter a nepřetržitě se formují podle současných potřeb buňky [6].

Mikrotubuly uskutečňují pohyb organel a membrán prostřednictvím speciálních proteinů tzv. mechanoenzymů, které využívají energii ATP. Jedná se prakticky o ATPázy s vazebným místem pro určité organely. Bílkoviny vyvolávající pohyb organely směrem k centru mikrotubulů (k tzv. mínus-konci) se nazývají dyneiny a bílkoviny vyvolávající pohyb

v opačném směru (k plus-konci) se označují kineziny. Tyto typy proteinů jsou významné pro růst a dělení buněk, sekreci, endocytózu, dělení jádra, transport organel a RNA. V průběhu meiózy a mitózy se mikrotubuly, kineziny a dyneiny uplatňují při rozchodu dceřiných chromozomů a prodlužování vřeténka. Dalším typem mechanoenzymů je myozin, působící v součinnosti s aktinovými vlákny. Zajišťuje tvorbu primárního chitinového septa při oddělování pupenu od mateřské buňky, řídí transport intracelulárních struktur podél aktinových vláken a podílí se na pohybu jádra, mitochondrií a sekrečních váčků. Základ myozinu tvoří dimerní proteinový komplex sestávající z globulární „hlavičky“, která je schopna hydrolýzy ATP, čímž umožňuje změnu chemické energie na pohyb [3], [6].

#### **2.1.3.10 Jádro**

Kvasinky, jakožto eukaryotní mikroorganismy, mají pravé jádro dosahující velikosti okolo 1  $\mu\text{m}$  v průměru a umístěné přibližně ve středu buňky. Jádro shromažďuje genetickou informaci buňky a je obklopeno dvojitou jadernou membránou s jadernými póry. Mezi dvěma vrstvami dvojité membrány se nachází perinukleární (mezimembránový) prostor vyplněný polotekutou hmotou. Membrány jsou v kontaktu s vnitřním obsahem jádra tzv. karyoplazmou a cytoplazmou. Složení karyoplazmy je vysoce heterogenní a variabilní. Kromě DNA a RNA obsahuje základní proteiny a histony bohaté na arginin, histidin a prolin. V membráně je obsaženo mnoho komplexů pórů složených z filament, která zasahují do struktury jádra i cytoplazmy. Hlavní úlohou jaderných pórů je umožnit průchod proteinů a molekul RNA přes jadernou membránu [6], [8].

Rozlišení chromozomů v jádře kvasinek je pomocí elektronové mikroskopie poměrně obtížné a nelze tak přesně stanovit jejich počet. Proto byl tento počet zjištěn na základě genetických studií. Jednotlivé chromozomy obsahují ve svojí struktuře specifický úsek tzv. centromeru, která se uplatňuje při dělení a segregaci chromozomů při procesu dělení jádra. V koncových úsecích chromozomů tzv. telomerách se vyskytují vazby mezi oběma vlákny DNA. Eukaryotní chromozomy jsou složeny z chromatinu, který se dále skládá z proteinů zvaných histony (H2A, H2B, H3, H4). Chromatin tvoří kulovité tvary – nukleozomální podjednotky, kolem kterých se obtáčí DNA [3].

Standardní složkou jádra je také jadérko srpkovitého tvaru, které se nachází těsně pod jadernou membránou. Dále je v jádře přítomné pólové tělísko vřeténka, z něhož vycházejí vlákna zvaná mikrotubuly, která jsou nezbytná při dělení jádra během rozmnožování buněk. Kromě výše zmíněných složek jádra, se u některých druhů kvasinek vyskytuje také nízkomolekulární kruhovitá DNA, která je obdobou plazmidů bakterií [3].

## 2.2 Rod *Cryptococcus*

### 2.2.1 Fylogenetické zařazení rodu *Cryptococcus*

Rod *Cryptococcus* se řadí do pododdělení Basidiomycota, podkmene Agaricomycotina, které je rozděleno do celkem tří tříd jmenovitě Agaricomycetes, Dacrymycetes a Tremellomycetes. Třída Tremellomycetes je tvořena čtyřmi řády – Cystofilobasidiales, Filobasidiales, Tremellales a Trichosporonales. Právě řády Tremellales a Filobasidiales zahrnují významnou část druhů rodu *Cryptococcus* [6].

Na základě analýzy rRNA genových sekvencí není fylogenetická pozice Cystofilobasidiales jednoznačně dohodnuta, totéž platí i u řádů Tremellales a Trichosporonales. V literatuře lze najít případy, kdy tyto dva poslední jmenované řády nejsou rozlišeny [6].

Zařazení kmenů rodu *Cryptococcus*, používaných v této bakalářské práci, je uvedeno níže v rámci charakteristiky jednotlivých druhů tohoto rodu.

### 2.2.2 Obecná charakteristika rodu *Cryptococcus*

Rod *Cryptococcus* zahrnuje kvasinky elipsovitého nebo kulovitého tvaru, které se rozmnožují multilaterálním pučením. Zástupci rodu tvoří měkké, slizovité až mukoidní kolonie různé velikosti a barvy. Jednotlivé buňky jsou obklopeny polysacharidovou kapsulí typickou pro druh *Cryptococcus neoformans*. Velikost kapsule závisí na genetice daného druhu a podmínkách růstu [6], [13].

Kvasinky rodu *Cryptococcus* jsou nefermentující a vyznačují se schopností zpracovat inositol jako výhradní zdroj uhlíku za účelem produkce ureázy. Jedná se o polyfyletický rod zahrnující přes 50 druhů. Molekulární studie prokázaly, že některé druhy tohoto rodu jsou na základě variabilních fyziologických a biochemických charakteristik taxonomicky heterogenní [13].

Zástupci rodu *Cryptococcus* se vyskytují v půdě, vodě, vzduchu. Mnoho kmenů bylo izolováno z listů rostlin, živočichů nebo z oblastí s extrémními klimatickými podmínkami např. z Antarktidy [6].

Rozmnožování kvasinek rodu *Cryptococcus* může být pohlavní a nepohlavní. Nejznámější zástupce rodu *Cryptococcus neoformans* disponuje haploidními buňkami, které se nepohlavně rozmnožují pučením. V rámci pohlavního rozmnožování rozlišujeme kmeny heterotalické a homotalické. U heterotalických kmenů dochází k fúzi buněk opačného párovacího typu na základě rozpoznání specifického signálního feromonu. Jádro se nedělí, ale dochází k tvorbě dikaryonu, tedy dvou pohlavně různých jader. Koncové části buněk se spojí za vzniku bazidia, kde probíhá teprve dělení jádra a meióza. Následující mitózou vznikají haploidní bazidiospory, které tvoří čtyři dlouhé řetízky. U homotalických kmenů probíhá proces obdobně, ovšem mezi jedinci stejného párovacího typu [14].

*Cryptococcus neoformans* a *Cryptococcus gattii* jsou jediné dva druhy, které jsou pro člověka patogenní díky jejich unikátní schopnosti růstu při 37 °C. *Cryptococcus neoformans* je považován za hlavního původce onemocnění zvaného kryptokokóza, která byla poprvé

zaznamenána v roce 1894 a dnes je jednou z hlavních příčin úmrtí HIV pozitivních pacientů. Nicméně další druhy jako *Cr. albidus*, *Cr. laurentii* a *Cr. curvatus* byly označeny také jako původci infekcí [13].

Utilizace myo-inositolu je důležitým faktorem v systematice kvasinek. Rod *Cryptococcus* je schopen zpracovat myo-inositol, a proto je označován jako myo-inositol pozitivní. Utilizace glukuronátu je však vhodnějším rozpoznávacím znakem, protože glukuronát je tvořen v prvním kroku katabolismu myo-inositolu. V buněčné stěně rodu *Cryptococcus* byla také zjištěna přítomnost xylózy, která může sloužit jako další klíčový rozpoznávací znak v systematice bazidiomycet. Na základě přítomnosti xylózy lze od sebe odlišit podkmeny Agaricomycotina, Ustilagomycotina a Pucciniomycotina. Právě podkmen Agaricomycotina disponuje inositol-glukuronát-xylóza metabolickou dráhou [6].

### 2.2.3 Vybrané druhy rodu *Cryptococcus*

#### 2.2.3.1 *Cryptococcus gastricus* Reiersöl & di Menna (1958)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Filobasidiales, skupina *gastricus* [6]

**Synonyma:** žádná [6]

#### **Obecná charakteristika:**

*Cryptococcus gastricus* vytváří na sladovém agaru kolonie s krémovou nebo máslovou konzistencí bílé až nažloutlé barvy a s hladkým jemným povrchem. Buňky tvoří jednoduché kulovité tvary, na jejichž povrchu se může projevit přítomnost lipidových kapének v podobě drobných hrbolků. Buňky se mohou vyskytovat buď samostatně, nebo v menších skupinách. Velikostí dosahují přibližně 5,1–5,4 µm. Mezi sacharidy obsažené v buňce patří např. glukóza, manóza nebo xylóza [6].

Výskyt tohoto druhu je znám především v půdách v oblastech s chladnějším klimatem (Island, Aljaška, Rusko), avšak byl objeven i v gastrointestinálním traktu savců nebo v kožní tkáni velryb v Arktickém oceánu [6].

#### 2.2.3.2 *Cryptococcus terreus* di Menna (1954)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Filobasidiales, skupina *aerius* [6]

#### **Synonyma:**

*Cryptococcus himalayensis* S. Goto & Sugiyama (1970)

*Cryptococcus elinovii* W. Golubev (Golubev and Tauson 1979) [6]

#### **Obecná charakteristika:**

Přestože na základě morfologie a stavby jednotlivých druhů se *Cr. himalayensis* a *Cr. elinovii* považují za synonymum *Cr. terreus*, liší se navzájem odezvou při asimilaci maltózy a melezitózy [6].

Kolonie *Cr. terreus* na sladovém agaru po dvoutýdenní kultivaci při 20 °C jsou krémově zbarvené, lehce mukoidní s lesklým a jemným povrchem. Tvary buněk jsou povětšinou kulovité a vyskytují se samostatně nebo s pupeny [6].

Výskyt *Cr. tereus* byl potvrzen v půdách a v oblastech hojně porostlých vegetací. Mezi jeho blízké příbuzné druhy patří *Cr. fuscescens* a *Cr. phenolicus*. V oblasti biotechnologií je významná schopnost degradace fenolu spolu s bakterií *Pseudomonas putida* a konverze kyseliny skořicové na styren [6].

#### **2.2.3.3 *Cystofilobasidium macerans* Sampaio (Libkind et al. 2008)**

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Cystofilobasidiales, skupina cystofilobasidium [6]

**Anamorfní stádium:** *Cryptococcus macerans* (Frederiksen) Phaff & Fell [6]

**Synonyma:**

*Rhodotorula lini* Wieringa (1956) nom. nud.

*Rhodotorula macerans* Frederikson (1956)

*Cryptococcus macerans* (Frederiksen) Phaff & Fell (1970)

*Cryptococcus hungaricus* (Zsolt) Phaff & Fell var. gallicus Saëz (1979) [6]

**Obecná charakteristika:**

Kolonie *Cr. macerans* jsou po šestidenním růstu na sladovém agaru tvořeny buňkami elipsoidního tvaru a velikosti 2,5–12 µm. Vyskytují se buď jednotlivě, nebo v párech. Barva kolonií je jasně korálově červená až růžovo-broskvová s patrným třpytem. Okraje jsou hladké, celistvé a povrch jemný s máslovou konzistencí. Rozmnožují se převážně tzv. polárním pučením [6].

Tento druh se vyskytuje jak ve vodě, tak i na souši. Studie z roku 2007 uvádějí, že *Cr. macerans* je adaptován na chladné klima, neboť byl objeven v ledu v Norsku, na Islandu nebo v Argentině. *Cr. macerans* je schopen produkce enzymů např. polygalakturonázy, pektinlyázy nebo pektinesterázy [6].

Z biotechnologického hlediska je významná jeho spojitost se zpracováním lnu. Podílí se na separaci vláken z rostlin při technice zvané máčení lnu. V klinické oblasti je znám jako původce meningoencefalitidy, ale jeho klinická významnost zatím nebyla dále studována [6].

#### **2.2.3.4 *Filobasidiella neoformans* Kwon-Chung (1975)**

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Tremellales, skupina filobasidiella [6]

**Anamorfní stádium:** *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (1901) [6]

**Synonyma:** *Filobasidiella neoformans* Kwon-Chung var. neoformans (Kwon-Chung et. al 1982a) [6]

**Obecná charakteristika:**

Existuje celkem pět sérotypů, které jsou podle aktuálních poznatků spojeny s dvěma druhy – *Cr. neoformans* (sérotyp A, D, AD) a *Cr. gatii* (sérotyp B, C). Sérotyp A je označován jako varieta *Cr. neoformans* var. *grubii* a sérotyp D jako *Cr. neoformans* var. *neoformans* [6].

Na sladovém agaru vytvářejí bílé až krémově zbarvené kolonie s mukoidní strukturou a celistvým okrajem. Průměr buněk může dosahovat 3–5 µm, u haploidních 2,5–10 µm [6].

V médiu s polyfenolovými sloučeninami a aminy, kde byly naočkovány haploidní buňky, se objevuje hnědé zbarvení v průběhu 1–5 dní. Příčinou tohoto zbarvení je produkce melaninu a intenzita hnědé barvy se odvíjí od složení média a typu kmene [6].

*Cr. neoformans* a *Cr. gattii* tvoří typické polysacharidové kapsule, které je možné vizualizovat India tuší (India ink). Jedná se o negativní barvení, kterým lze určit tloušťku kapsule. Pro dva výše zmíněné druhy má kapsule nesmírný význam z hlediska virulence a jako cílové místo odpovědi ochranných protilátek. Důležitost kapsule potvrzují i její rozměry, které mohou být v rozmezí 1–50  $\mu\text{m}$ , přičemž samotná buňka bez kapsule v případě *Cr. neoformans* dosahuje přibližně 2,5  $\mu\text{m}$ . Růst kapsule je umožněn nekovalentním spojením polysacharidových fibril mezi sebou a buněčnou stěnou. Velikost kapsule je přímo závislá na podmínkách vnějšího prostředí především na dostupnosti oxidu uhličitého, koncentraci železa a osmolaritě média. India tuš se kromě vizualizace kapsule používá také jako metoda pro výběr vzorků mozkomíšního moku. Avšak tato metoda postrádá specifitu a často je téměř nemožné rozeznat buňky kvasinek rodu *Cryptococcus* od leukocytů. Navíc pro provedení této metody je vyžadována vysoká kvalita India tuše [15], [16].

Poprvé byl *Cr. neoformans* izolován z broskvového džusu, nejvíce se však vyskytuje ve zvětralém trusu holubů a také v půdě. Některé kmeny byly dokonce izolovány ze dřeva stromů. Největší význam má tento kmen v klinické oblasti. Jedná se o původce dýchacích a neurologických onemocnění u lidí a zvířat. Způsobuje například pneumonii, meningitidu, sepsi nebo i povrchové infekce. Bylo zjištěno, že za onemocněním zvaným kryptokokóza stojí především *Cr. neoformans* a *Cr. gattii*. Nákaza probíhá nejčastěji tak, že člověk nebo zvíře danou kvasinku vdechne do plic, odkud se rozšíří až do mozku. Nejvíce náchylní k onemocnění kryptokokózou jsou lidé se sníženou imunitou např. HIV pozitivní osoby, pacienti s leukémií nebo jiným typem rakoviny [6].

V roce 2005 byla zveřejněna kompletní sekvence genomu *Cr. neoformans* var. *neoformans*. Studie prokázala, že obecně *Cr. neoformans* disponuje 20 Mb genomem, který obsahuje asi 6500 intronových sekvencí. Genom je bohatý na transpozony, jejichž přítomnost řídí dikaryotickou nestabilitu a fenotypovou variaci. *Cr. neoformans* kóduje také unikátní geny, které přispívají k neobvyklým virulentním vlastnostem. U druhu *Cr. neoformans* na rozdíl od *S. cerevisiae* nebyla prokázána duplikace kompletního genomu. Ve studii byly zkoumány dva kmeny JEC21 a B3501A variety *Cr. neoformans* var. *neoformans* (sérotyp D). Bylo zjištěno, že kmen JEC21 má 19 Mb genom se 14 chromozomy s velikostí od 762 kb do 2,3 Mb, zatímco B3501A disponuje 18,5 Mb genomem. Přibližně 5 % genomu obou kmenů tvoří transpozony vtěsnané do specifických úseků každého chromozomu, které sousedí s rDNA repetitivy a mating-type lokusem (MAT). MAT lokus je speciální úsek genomu, který řídí spojení mezi virulencí a párovacím typem. Oba dva analyzované kmeny se řadí k inbredním kmenům alfa párovacího typu, který je nejběžnějším párovacím typem u klinických izolátů a izolátů získaných ze životního prostředí [17].

### 2.2.3.5 *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner (1950)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Filobasidiales, skupina *albidus* [6]

**Variety druhu:**

*Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *albidus* (1967)

*Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *kuetzingii* (Fell & Phaff) Á. Fonseca, Scorzetti & Fell (2000)

*Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *ovalis* Sugiyama & Goto (1967) [6]

**Obecná charakteristika:**

Existují tři variety tohoto druhu – *Cr. albidus* var. *albidus*, *Cr. albidus* var. *kuetzingii* a *Cr. albidus* var. *ovalis*. První jmenovaná varieta tvoří na sladovém agaru při dvoutýdenní kultivaci krémové až narůžovělé kolonie s poměrně lesklým a hladkým povrchem měkké až máslovité konzistence. Buňky se vyskytují buď samostatně, anebo s pupeny. Mezi sacharidy obsažené v buňce patří glukóza, manóza a xylóza. První izolace této variety byla provedena z rostlinného nektaru a dále také z ledu. Rozdíl mezi *Cr. albidus* var. *albidus* a *Cr. albidus* var. *kuetzingii* se objevují ve dvou oblastech rDNA, kde se liší ve třech nukleotidech, které jsou nahrazeny jinými, zatímco při porovnání s *Cr. albidus* var. *ovalis* je nahrazeno celkem pět nukleotidů v sekvenci rDNA [6].

*Cr. albidus* var. *kuetzingii* tvoří na sladovém agaru při stejných kultivačních podmínkách krémově zbarvené, lehce mukoidní kolonie o velikosti 4,9–5,8 µm s lesklým a jemným povrchem. Vyskytují se nejčastěji v půdě nebo ovoci, poprvé byl však izolován ze psí kůže a ze vzduchu. Tato varieta druhu není schopna asimilovat maltózu a melezitózu [6].

*Cr. albidus* var. *ovalis* za stejných kultivačních podmínek vytváří nažloutlé až krémové kolonie máslovitého vzhledu s lesklým a jemným povrchem. Buňky mají široce elipsoidní tvar a vyskytují se samostatně nebo s pupeny. Dosahují velikosti cca 4,7–5,8 µm [6].

Význam v oboru biotechnologie je především v produkci enzymů např. extracelulárních xylanáz nebo pektináz, které jsou schopné biokonverze odpadních vod z mlýnů na výrobu olivového oleje. V zemědělství a potravinářském průmyslu se komerčně uplatňuje jako přípravek proti hnilobě již sklizených citrusů a dalšího ovoce, kterou způsobují patogenní plísně. Ze zdravotního hlediska může být původcem infekcí, ty se však vyskytují poměrně vzácně. Vyšší důraz je kladen na fakt, že je až téměř rezistentní vůči lékům používaných pro onemocnění způsobené druhem *Cr. neoformans*, avšak po aplikaci séra používaného pro stanovení sérotypu *Cr. neoformans* se jeví jako velmi podobný sérotypu A [6].

### 2.2.3.6 *Cryptococcus aerius* (Saito) Nannizzi (Pollacci and Nannizzi 1927)

**Fylogenetické umístění druhu:** řád Filobasidiales, skupina *aerius* [6]

**Synonyma:**

*Torula aeria* Saito (1922)

*Torulopsis aeria* (Saito) Lodder (1934)

*Paratorulopsis aeria* (Saito) Novák & Zsolt (1961)

*Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *aerius* (Saito) Phaff & Fell (1970)

*Paratorulopsis pseudoaeria* (Zsolt) Novák & Zsolt (1961) [6]

### **Obecná charakteristika:**

Jedná se o druh, který se řadí do skupiny *aerius* řádu Filobasidiales a tvoří na sladovém agaru bílo-nažloutlé až narůžovělé kolonie máslovitého vzhledu s hladkým a jemným povrchem. Buňky se spojují v menší řetízky nebo existují samostatně, někdy i s pupeny [6].

Mnoho let byl *Cr. aerius* považován za jednu z variet *Cr. albidus*. Rozpoznat tyto druhy lze na základě reakce s Lugolovým roztokem (roztok jodu), která dokazuje přítomnost sloučenin na bázi škrobu. *Cr. aerius* vykazuje téměř nebo úplně negativní reakci, zatímco *Cr. albidus* a *Cr. magnus* dávají pozitivní reakci (jsou zbarveny modře). Mezi blízce příbuzné druhy patří *Cr. terreus* a *Cr. tericola* [6].

*Cr. aerius* se vyskytuje převážně v půdách, některé kmeny byly izolovány ze vzduchu a listů rostlin. Převaha určitých kmenů v půdách je přisuzována jejich polysacharidovým kapsulím. Hlavní význam druhu spočívá v produkci enzymů – beta-glukanázy a beta-xylánázy [6].

#### **2.2.3.7 *Cryptococcus diffluens* (Zach) Lodder & Kreger-van Rij (1952)**

**Fylogenetické umístění druhu:** řád Filobasidiales, skupina *albidus* [6]

#### **Synonyma:**

*Torulopsis diffluens* Zach (Wolfram and Zach 1934b)

*Rhodotorula diffluens* (Zach) Hasegawa, Banno & Yamauchi (1960)

*Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner var. *diffluens* (Zach) Phaff & Fell (1970)

*Torula gelatinosa* Saito (1922)

*Rhodotorula gelatinosa* (Saito) Hasegawa, Banno & Yamauchi (1960)

*Torulopsis albida* (Saito) Lodder var. *japonica* Lodder (1934)

*Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin var. *innocuous* Benham (1955)

*Cryptococcus diffluens* Zach var. *uruguayensis* Artagaveytia-Allende & Aciole de Queiroz (1970) [6]

### **Obecná charakteristika:**

*Cr. diffluens* tvoří na sladovém agaru krémové, mukoidní kolonie s jemným a hladkým povrchem. Tvary buněk bývají obvykle široce elipsoidní a dosahují velikosti 5,7–5,9 µm. Vyskytují se samostatně nebo s pupeny. Charakteristická je tvorba kapsulí [6].

Kmeny byly poprvé vyizolovány ze vzduchu (Japonsko), dále také z rány na lidské kůži. Častější výskyt je pak především v půdě nebo rostlinách [6].

Dlouhou dobu byl stejně jako *Cr. aerius* považován za synonymum nebo za jednu z variet kmene *Cr. albidus*. Na základě fylogenetické analýzy nukleotidových sekvencí v rDNA byl zařazen do skupiny *albidus* řádu Filobasidiales a je blízkým příbuzným *Cr. liquefaciens* a *Cr. albidosimilis* [6].

V klinické oblasti byl prokázán výskyt u lidí s atopickou dermatitidou, ale jeho role v tomto onemocnění je stále neznámá. Na základě několika studií byl *Cr. diffluens* přisuzován také vliv na onemocnění zvaném kryptokokóza. Zajímavým zjištěním byl ale fakt, že téměř nebo vůbec nereaguje na léky proti této nemoci, jejíž hlavní původce je *Cr. neoformans* [6].

### 2.2.3.8 *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C.E. Skinner (1950)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Tremellales, skupina *bulleromyces* [6]

**Synonyma:**

*Torula laurentii* Kufferath (1920)

*Torulopsis laurentii* (Kufferath) Lodder (1934)

*Rhodotorula laurentii* (Kufferath) Hasegawa, Banno & Yamauchi (1960)

*Rhodotorula nitens* Mackenzie & Auert (1963) [6]

**Obecná charakteristika:**

*Cryptococcus laurentii* se řadí do skupiny *bulleromyces* řádu Tremellales. V závislosti na druhu použitého média může tvořit vypouklé, matné, světle šedé až krémově zbarvené kolonie s mukoidním vzhledem a lehce narušeným okrajem. Buňky mají široce elipsoidní až cylindrický tvar a dosahují velikosti přibližně 6,5 µm. Obvykle převažuje tzv. polární pučení. Mezi sacharidy přítomné v buňce patří především glukóza, manóza a xylóza. *Cr. laurentii* se nejčastěji vyskytuje v půdě, mořské vodě a také v trusu holubů [6].

Z biotechnologického pohledu je významná produkce enzymů, které hrají roli při štěpení vazeb přítomných v epoxidech. Vysoké výtěžky nenasycených mastných kyselin (olejová, linoleová kyselina) byly zaznamenány u druhů z Antarktidy. *Cr. laurentii* je v oblasti zemědělství a potravinářském průmyslu znám jako prostředek působící proti hnilobě již sklizených citrusů a dalšího ovoce (jablka, broskve, hrušky, jahody). Je známa také schopnost tohoto druhu redukovat germinaci (pučení) konidií ušlechtilé plísně *Botrytis cinerea*, která je původcem plísní na potravinách. Bylo také identifikováno několik kmenů ze vzorků získaných z lidského těla např. nádorů, plic nebo u pacientů s onemocněním AIDS [6].

*Cr. laurentii* byl dlouhou dobu považován za velice různorodý druh, ale až díky nynějším studiím vyplynulo, že se jedná o celý komplex různých druhů. Na základě analýzy oblasti ITS (*internal transcribed spacer*) a genu 28S rRNA provedenou japonskými vědci, byla zjištěna vnitrodruhová rozmanitost *Cr. laurentii*. Výsledkem této studie bylo rozdělení analyzovaných kmenů *Cr. laurentii* do fylogenetických skupin I a II [18].

Diferencovat *Cr. laurentii* od dalších druhů často není možné. Některé z druhů byly dokonce chybně identifikovány jako *Cr. neoformans* nebo *Cr. gattii* a to především díky produkci látek na bázi melaninu. Avšak na rozdíl od dvou výše zmíněných druhů, je *Cr. laurentii* schopen asimilovat laktózu, melibiózu a erythritol [6].

### 2.2.3.9 *Cryptococcus flavescens* (Saito) C.E. Skinner (1950)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Tremellales, skupina *bulleromyces* [6]

**Synonyma:**

*Torula flavescens* Saito (1922)

*Torulopsis flavescens* (Saito) Lodder (1934)

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

*Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C.E. Skinner var. *flavescens* (Saito) Lodder & Kreger-van Rij (1952)

*Cryptococcus nodaensis* (Sato et al. 1999) nom. inval. (no Latin diagnosis) [6]

### **Obecná charakteristika:**

*Cr. flavescens* se stejně jako *Cr. laurentii* řadí do skupiny *bulleromyces* řádu Tremellales. Na sladovém agaru po sedmi dnech a při 20 °C tvoří ploché až lehce zvýšené kolonie, matného a mukoidního vzhledu s šedo-krémovou barvou, hladkým povrchem a mnohdy se zvlněným okrajem. Tvar buněk je nejčastěji nepravidelný, mnohdy i cylindrický až elipsoidní. Velikosti buněk se pohybují v rozmezích 8–17×3–6,5 µm. Pučení může být polární nebo laterální (postranní). Buňky se také mohou shlukovat do krátkých pseudohyfních řetízků [6].

Donedávna byl *Cr. flavescens* považován za synonymum *Cr. laurentii*, i když analýza buněčných proteinů a genové sekvence rRNA nasvědčovala, že jde o odlišný druh. Podrobnější analýzou genů rRNA byl *Cr. flavescens* zařazen do I. fylogenetické skupiny *Cr. laurentii* spolu s druhem *Cr. laurentii* [6].

*Cr. flavescens* se vyskytuje zejména ve vzduchu a obilných a kukuřičných zrnech těsně po sklizni. Některé kmeny byly izolovány z půdy, dřeva nebo nektaru rostlin. Významná je produkce glutaminázy a kyselých extracelulárních polysacharidů např. D-xylózy, D-manózy a D-glukuronové kyseliny. V potravinářském průmyslu je znám pro svoji schopnost potlačovat klasové fuzariózy (choroby obilnin – zejména pšenice a ječmene) [6].

#### **2.2.3.10 *Cryptococcus flavus* (Saito) Á. Fonseca, Boekhout & Fell (2009)**

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Tremellales, nezařazen do žádné skupiny [6]

#### **Synonyma:**

*Torula flava* Saito (1922)

*Chromotorula flava* (Saito) F.C. Harrison (1928)

*Rhodotorula flava* (Saito) Lodder (1934)

*Rhodotorula tokyoensis* Kobayoshi ex Hasegawa var. *flava* (Saito) Hasegawa (1958)

*Cryptococcus flavus* (Saito) Phaff & Fell (1970) nom. inval. [6]

### **Obecná charakteristika:**

Přestože je *Cr. flavus* součástí řádu Tremellales, neřadí se do žádné konkrétní skupiny. Kultivací na sladovém agaru lze získat žluto- hnědě zbarvené kolonie ve tvaru menších pásů částečně se lesknoucích a s celistvým okrajem. Buňky mohou být různorodého tvaru (cylindrické, kulovité, elipsoidní) s velikostí 7–11×2,2–3,8 µm. Mohou také tvořit krátké řetízky nebo filamenta o délce 30 µm. Převažuje pučení polární, ale také laterální není výjimkou. Mezi sacharidy obsažené v buňce patří hlavně glukóza, manóza a xylóza [6].

Mezi blízkce příbuzné druhy lze zařadit např. *Cr. paraflavus*, často označovaný jako sesterský druh *Cr. flavus*. Na základě mnoha studií je *Cr. flavus* řazen do řádu spolu s *Bullera variabilis* a *B. miyagiana* nebo je také spojován s druhy *Tremella aurantia* a *Tremella mikrospora* atd [6].

*Cr. flavus* se vyskytuje ve vzduchu, v humusu (Japonsko) a v listech Šťavele kyselého (Rusko). Některé vzorky kmenů pocházejí také z USA, Německa a z Brazílie, kde vykazovaly vysokou úroveň produkce amylázy. *Cr. flavus* je fenotypově podobný druhu *Cr. laurentii*, avšak *Cr. flavus* nedisponuje schopností asimilovat ethanol a kreatinin a naopak dokáže produkovat látky na bázi škrobu [6].

#### 2.2.3.11 *Cryptococcus magnus* (Lodder & Kreger-van Rij) Baptist & Kurtzman (1976)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Filobasidiales, skupina *floriforme* [6]

**Synonyma:**

*Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C.E. Skinner var. *magnus* Lodder & Kreger-van Rij (1952)

*Cryptococcus ater* Castellani (1960) nom. nud.

*Cryptococcus laurentii* var. *magnus* forma *ater* Castellani ex W.B. Cooke (1966)

*Cryptococcus ater* (Castellani ex Cooke) Phaff & Fell (Lodder 1970) nom. inval.

*Cryptococcus ater* (Castellani ex Cooke) Rodrigues de Miranda (Kreger-van Rij 1984) nom. inval. [6]

**Obecná charakteristika:**

*Cr. magnus* je řazen do skupiny *floriforme* řádu Filobasidiales. Po dvou týdnech růstu na agaru, který je složen ze sladového extraktu, kvasničného extraktu a zčásti také ze sóje, jsou patrné žlutohnědé kolonie mukoidního vzhledu s jemným a lesklým povrchem. Jednotlivé buňky po dvou dnech růstu v bujónu dosahují kulovitěho tvaru a velikosti  $7,6\text{--}9,1 \times 7\text{--}8,8 \mu\text{m}$ . Mohou se vyskytovat samostatně nebo s pupeny. Mnoho buněk také disponuje kapsulemi. Stejně jako u několika předchozích kmenů, tak i v případě *Cr. magnus* jsou hlavními sacharidy obsaženými v buňce glukóza, manóza a xylóza [6].

Rozsáhlý výskyt *Cr. magnus* je potvrzen skutečností, že jedny z prvních kmenů byly izolovány ze vzduchu (Nizozemí), z rostlin (Itálie, Portugalsko), půdy, stromů (dub, javor, citrusovník), ze vzorků ledu (Špicberky) a mořské vody. Fylogenetickou analýzou nukleotidových sekvencí rDNA bylo zjištěno, že mezi v blízkce příbuzné druhy *Cr. magnus* patří *Filobasidium floriforme* a *F. elegant* [6].

#### 2.2.3.12 *Cryptococcus carnescens* (Verona & Luchetti) Takashima, Sugita, Shinoda & Nakase (2003)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Tremellales, skupina *victoriae* [6]

**Synonyma:**

*Torulopsis carnescens* Verona & Luchetti (1936) [6]

**Obecná charakteristika:**

Z taxonomického hlediska se *Cr. carnescens* řadí do skupiny *victoriae* řádu Tremellales. Po dvoutýdenní kultivaci na sladovém agaru lze pozorovat kolonie ve tvaru pásů s vypouklým povrchem, žluto-hnědým až šedým zbarvením, mukoidním vzhledem a poměrně rovným a neporušeným okrajem. Tvary buněk mohou být široce elipsoidní, vejčité i hruškovité a dosahují velikosti  $3,5\text{--}6 \times 3\text{--}5 \mu\text{m}$  [6].

*Cr. carnescens* je znám především z vinné révy odrůdy Muškát. Mnoho dalších kmenů, později identifikovaných jako *Cr. carnescens*, bylo izolováno např. z půdy, lesů (Rakousko), listů rostlin (Portugalsko) a ledu (Špicberky) [6].

Na základě fyziologické podobnosti s *Cr. laurentii* a dalšími zástupci ze skupiny *victoriae* je velmi obtížné tyto jednotlivé druhy mezi sebou rozlišit. Existují však některé charakteristické znaky např. neschopnost asimilovat ethanol, kreatinin a nemožnost růstu při 30 °C, díky kterým lze tyto dva druhy diferencovat [6].

#### 2.2.3.13 *Cryptococcus friedmannii* Vishniac (1985b)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Filobasidiales, skupina *albidus* [6]

**Synonyma:** žádná [6]

##### **Obecná charakteristika:**

*Cr. friedmannii* je zařazen do skupiny *albidus* řádu Filobasidiales. Na agaru, který je složen ze sladového a kvasničného extraktu v kombinaci se sójou, tvoří tento druh po dvou týdnech a při teplotě 18 °C krémové až krémovo-oranžové kolonie s máslovitým vzhledem a matným a hladkým povrchem. Po třídenní kultivaci v bujónu lze sledovat pod mikroskopem široce elipsoidní buňky, dosahující velikosti 6,3–8×5–6 µm a vyskytující se samostatně nebo s pupeny [6].

Jedna z prvních izolací tohoto druhu byla provedena z kamene porostlého lišejníkem (Antarktida). Některé další kmeny byly získány z půdy na Islandu, Aljašce nebo v Rusku. Stejně jako ostatní druhy pocházející z Antarktidy, tak i *Cr. friedmannii* je schopen růstu bez přidaných vitamínů a při teplotě maximálně do 25 °C. Mezi fylogeneticky příbuzné druhy patří *Cr. saitoi*, který se liší od *Cr. friedmannii* v několika nukleotidových sekvencích, což je rozhodující při molekulární identifikaci těchto druhů [6].

#### 2.2.3.14 *Cryptococcus saitoi* Á. Fonseca, Scorzetti & Fell (2000a)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Filobasidiales, skupina *albidus* [6]

##### **Synonyma:**

*Hansenula amylofaciens* Dietrichson (1954) nom. nud.

*Naganishia globosus* S. Goto (1963)

*Torulopsis dattila* (Kluyver) Lodder var. *armeniaca* Sarukhanyan (1957) [6]

##### **Obecná charakteristika:**

*Cr. saitoi* je stejně jako *Cr. friedmannii* řazen do skupiny *albidus* řádu Filobasidiales. Po dvoutýdenní kultivaci na agaru (sladový extrakt, kvasniční extrakt, sója) lze pozorovat krémově žluté kolonie s máslovitým vzhledem a matným a hladkým povrchem. Po třech dnech kultivace v bujónu lze mikroskopem sledovat široce elipsoidní buňky, samostatně se vyskytující nebo s pupeny. Buňky dosahují velikosti přibližně 7,5–9,3×6–7,2 µm [6].

První izolace tohoto druhu byly provedeny ze vzduchu (Nizozemí), půdy (Antarktida), listů keře *Cistus ladanifer* (Portugalsko) a z hlenu pacienta s podezřením na tuberkulózu (Norsko) [6].

Původně byl *Cr. saitoi* považován za askosporogenní kvasinku, později však byl označen jako synonymum *Cr. albidus*. Dnes již toto tvrzení neplatí, ale *Cr. saitoi* je zařazen do skupiny *albidus* a jeho blízkce příbuzným druhem je *Cr. friedmannii*. Další studie hovoří o

podobnosti mezi druhy *Cr. saitoi*, *Cr. albidus* a *Cr. diffluens*. Bylo zjištěno, že tyto druhy mají shodný “klast” bílkovin (klast IX). Fyziologicky jsou si také velmi podobné, ale *Cr. saitoi* se odlišuje schopností asimilovat L-tartrát a sacharát [6].

#### 2.2.3.15 *Cryptococcus tephrensensis* Vishniac (2002)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Tremellales, skupina *victoriae* [6]

**Synonyma:** žádná [6]

**Obecná charakteristika:**

*Cr. tephrensensis* patří do skupiny *victoriae* řádu Tremellales. Kultivací na sladovém agaru vznikají kolonie ve tvaru pásů s lehce zvýšeným žluto-hnědým a lesklým povrchem, mukoidním až máslovitým vzhledem a celistvým okrajem. Buňky mají obvykle tvar elipsoidní, citronovitý nebo kapkovitý a dosahují velikosti  $5\text{--}10 \times 2\text{--}7 \mu\text{m}$ . Z hlediska rozmnožování je velmi časté polární pučení [6].

Původně jediným místem výskytu tohoto druhu byla sopečná půda na Islandu zvaná tephra. Nicméně některé dříve neznámé kmeny izolované v Koreji a ve Finsku byly na základě analýzy D1/D2 sekvencí také přiřazeny ke druhu *Cr. tephrensensis*. Stejnou analýzou byl objeven možný sesterský druh *Cr. tephrensensis*, který se liší ve třech nukleotidech a je nazýván jako *Cr. tephrensensis* var. *solis*, avšak nebyl zatím dostatečně popsán [6].

#### 2.2.3.16 *Cryptococcus victoriae* M.J. Montes, Belloch, Galiana, M.D. García, C. Andrés, S. Ferrer, Torres-Roríguez & J. Guinea (1999)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Tremellales, skupina *victoriae* [6]

**Synonyma:** žádná [6]

**Obecná charakteristika:**

*Cr. victoriae* je zařazen stejně jako *Cr. tephrensensis* do skupiny *victoriae* řádu Tremellales. Kolonie rostoucí na sladovém agaru vykazují typicky plochý nebo lehce zvýšený profil se žluto-hnědým hladkým povrchem mukoidního vzhledu a celistvým okrajem. Tvary buněk mohou být elipsoidní nebo citronovité a dosahují velikosti  $4,5\text{--}11 \times 3\text{--}4 \mu\text{m}$ . Typické je sympodiální pučení zanechávající jizvy a možnost spojení nových buněk do krátkých řetězků [6].

Nejhojnější výskyt poskytují oblasti jako Antarktida nebo Aljaška. Některé kmeny však byly izolovány i z nektaru rostlin v Německu a z povrchu jablek v Nizozemí. V literatuře bývá *Cr. victoriae* zaměněn za *Cr. laurentii*, ale na rozdíl od tohoto druhu nedokáže asimilovat ethanol, DL-laktát a kreatinin a není schopen růstu při 30 °C. Odlišit *Cr. victoriae* od ostatních druhů rodu *Cryptococcus* je možné pouze díky sekvenční analýze D1/D2 domén LSU rRNA genu a ITS sekvencí. Aktuálně je zařazen do II. fylogenetické skupiny *Cr. laurentii* spolu s *Cr. carnescens* a *Cr. peneaus* [6], [18].

### 2.2.3.17 *Bulleromyces albus* Boekhout & Á. Fonseca (Boekhout et al. 1991a)

**Fylogenetické zařazení druhu:** řád Tremellales, skupina *bulleromyces* [6]

**Anamorfní stádium:** *Bullera alba* (Hanna) Derx. [6]

**Synonymum:**

*Sporobolomyces albus* Hanna (Bisby et al. 1929)

*Bullera alba* (Hanna) Derx (1930) [6]

**Obecná charakteristika:**

Po sedmidenní kultivaci *Bulleromyces albus* na sladidlovém agaru při 17 °C lze pozorovat hnědo-krémové kolonie s typicky mukoidním vzhledem, plochým až lehce zvýšeným profilem, matným či lesklým povrchem a celistvým okrajem. Tvary povětšinou samostatně vyskytujících se buněk bývají nejčastěji elipsoidní nebo vejčité a dosahují velikosti 5–11 × 3–6 µm. Pučení převažuje polární a pupeny mohou být přisedlé nebo tvořit krátké „zoubky“. Buňky mohou také vytvářet hýfové výrůstky o délce až 80 µm a šířce 2–5 µm. Mezi v buňce přítomné sacharidy patří glukóza, galaktóza, manóza a xylóza [6].

Poprvé byl tento druh izolován ze slámy ječmene hřívnatého napadeného rzí v USA. Dále byly získány vzorky ze vzduchu, listů topolu a ořešáku. Výskyt teleomorfního stádia *B. albus* v přírodě zatím ještě nebyl pozorován. Naproti tomu anamorfní stádium *Bullera alba* se vyskytuje velmi hojně na povrchu listů. Mezi nejbližší příbuzné druhy *Bulleromyces albus* patří *Bullera unica*, dále pak *Tremella moriformis*, *T. nivalis* a *T. indecorata* [6].

## 2.3 Hmotnostní spektrometrie

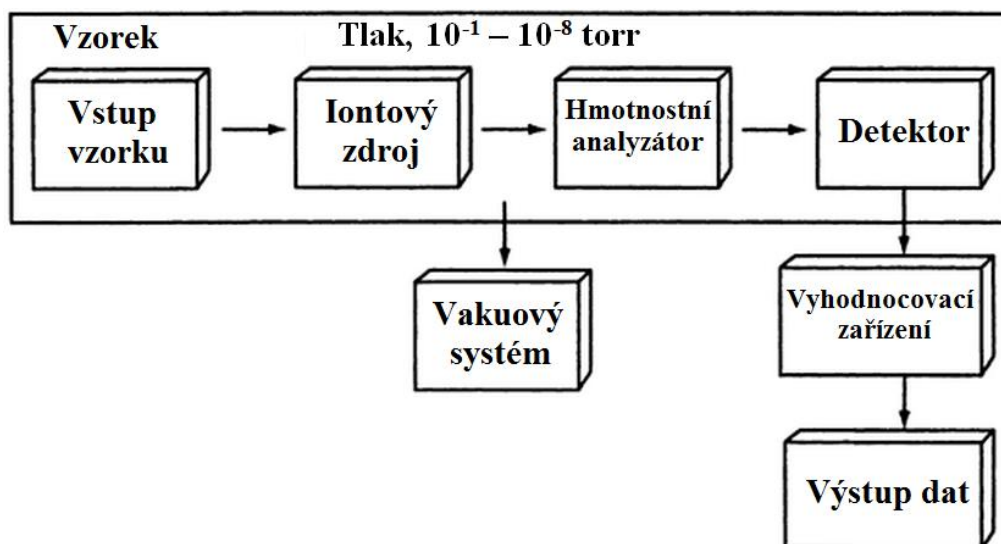
Hmotnostní spektrometrie (*mass spectrometry*) je analytickou technikou, která poskytuje kvalitativní i v některých případech kvantitativní informace o atomovém i molekulovém složení organických a anorganických materiálů a jejich chemické struktuře. Množství použitého vzorku pro analýzu je velmi malé v porovnání s jinými analytickými metodami. Hmotnostní spektrometrie disponuje všestranností, rychlostí a je také velmi užitečná pro výzkum vysoce reaktivních molekul v plynné fázi. Princip techniky spočívá v převodu vzorku na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty se separují na základě podílu hmotnosti a náboje  $m/z$ . Právě na základě separace iontů se řadí hmotnostní spektrometrie mezi metody separační [19]-[21].

Hmotnostní spektrometrie vyniká především přesností a několika dalšími výhodami. První z nich je zvýšená citlivost oproti ostatním metodám, a to především díky analyzátoru, který umožňuje redukovat nežádoucí šum v pozadí. Informuje také o molekulové hmotnosti a množství izotopů jednotlivých chemických prvků. V některých případech však může spolehlivost hmotnostní spektrometrie selhat. Jedním z případů, kdy je tato technika výrazně limitována, je identifikace uhlovodíků, které produkují velmi podobné fragmentované ionty, nebo při rozlišení optických, geometrických izomerů a poloh substituentů na aromatickém kruhu [19].

V oblasti analýzy biomakromolekulárních látek a matric se hojně využívá tandemového spojení hmotnostní spektrometrie s jinými separačními technikami např. chromatografickými nebo elektromigračními. Velmi často užívaným online spojením je spojení plynové chromatografie (GC-MS) nebo kapalinové chromatografie (LC-MS) s hmotnostním spektrometrem anebo také spojení dvou hmotnostních spektrometrů (MS-MS). Díky tomuto zapojení se zvyšuje pravděpodobnost správné identifikace analytu, vzrůstá selektivita a výrazně klesají detekční limity [20].

### 2.3.1 Instrumentace

Základními součástmi každého hmotnostního spektrometru jsou vstup vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, vakuový systém, detektor a vyhodnocovací zařízení (**Obr. 1**). Iontový zdroj umožňuje tvorbu iontů z molekul analytu. Před vstupem do analyzátoru jsou ionty urychleny pomocí systému elektrod se středovým otvorem nebo jiným způsobem. Jakmile jsou ionty analyzovány, mohou směřovat dále k detektoru. Získaná informace je pak zpracována vyhodnocovacím zařízením [20], [22].



**Obr. 1** Schéma hmotnostního spektrometru [22].

### 2.3.2 Ionizace

Hmotnostní analyzátor jakéhokoliv hmotnostního spektrometru dokáže operovat pouze s nabitými částicemi, tzn. s ionty, které vznikly buď z atomů a molekul nebo příležitostně také z radikálů a zwitteriontů (amfoterní ionty). Ionizace je jedním z klíčových kroků celé analýzy a existuje tak široké spektrum typů ionizačních technik, které mohou probíhat za atmosférického nebo sníženého tlaku. Výběr techniky se odvíjí také od skupenství analyzované látky. Při ionizaci molekul obvykle dochází ke dvěma typům reakcí. Buďto je ionizována molekula a vzniká molekulární iont o jednotkovém náboji (kationt) a elektron, anebo se rozpadá molekulární iont na fragmentovaný iont a elektroneutrální částici [21], [23], [24].

Obecně lze rozlišit tzv. měkké a tvrdé ionizační techniky. První jmenovaný typ se využívá k analýze méně stabilních analytů, kdy ionizací vznikají kvazimolekulární ionty (někdy i negativní ionty). Měkké techniky také operují s mnohem menším množstvím fragmentovaných iontů než tvrdé ionizační techniky. Mezi měkké ionizační techniky se řadí chemická ionizace (CI), elektrosprejová ionizace (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), ionizace elektrickým polem (FI, FD), ionizace z vhodné termicky snadno ionizovatelné látky (thermospray) a desorpce a ionizace laserem (LDI, MALDI) [20], [22], [24].

V případě tvrdých technik jako je elektronová ionizace a ionizace plazmatem (ICP) se tvoří molekulové ionty (radikál kationt) a fragmenty. Při použití těchto technik lze na rozdíl od měkkých využívat knihovny hmotnostních spekter, neboť díky reprodukovatelnosti vzniku a poměru spekter nezávisí tato spektra na konkrétních podmínkách a jsou tak při každém měření shodná [20], [24].

#### 2.3.2.1 Elektronová ionizace

Ke vzniku iontů z neutrální částice je potřeba dostatečné množství energie. Nejvíce užívaným postupem, především u organických molekul, je ionizace svazkem urychlených

elektronů (elektronová ionizace, EI – *Electron impact*). Tato technika vyvinutá ve 20. letech 20. století je používána pro analýzu plynů, těkavých sloučenin a par kovů. Elektrony emitované žhaveným kovovým vláknem z wolframu nebo rhenia (katoda) jsou urychleny elektrostatickým polem a disponují kinetickou energií o hodnotě 70 eV. Při následné interakci s cílovou molekulou dochází k vyražení elektronu (případně i více elektronů), čímž vznikají jednou nebo vícenásobně nabitě molekulové ionty. Zdroj elektronové ionizace disponuje dostatečnou energií k fragmentaci vzorků molekul, přesto však některé sloučeniny nejsou schopné tvorby molekulárních iontů technikou elektronové ionizace [19], [20], [22], [24].

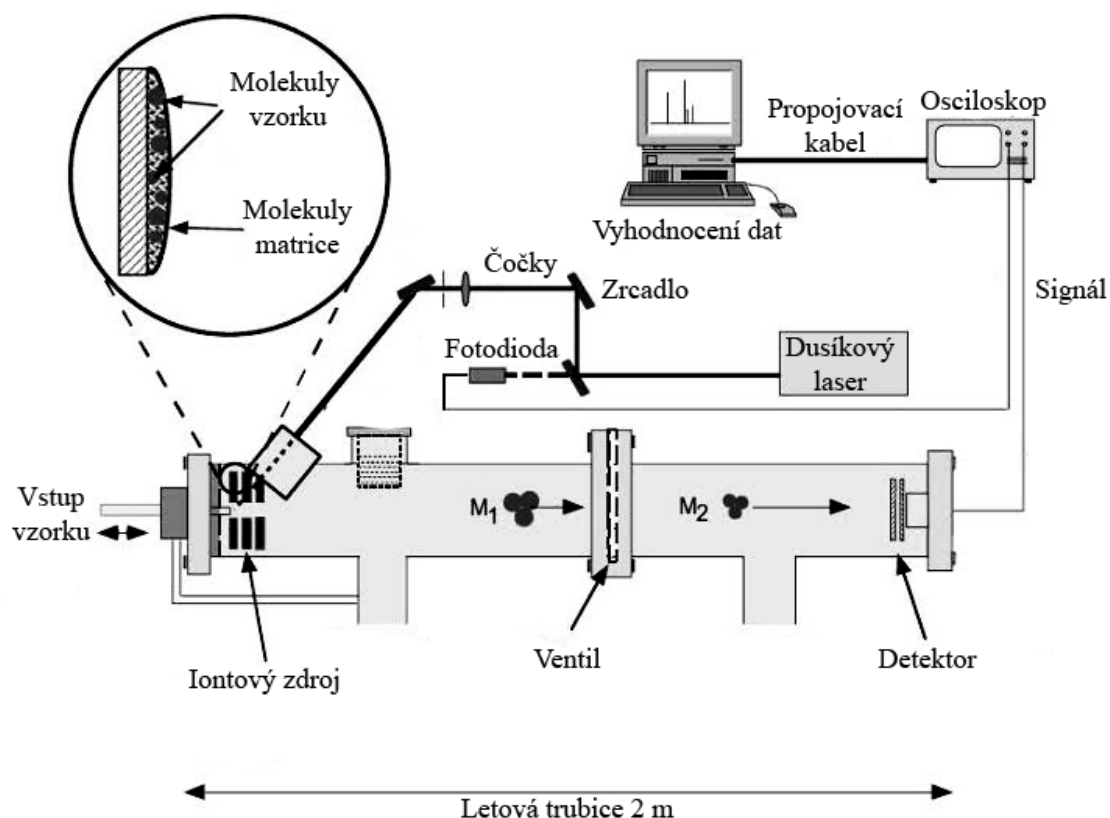
### 2.3.2.2 Chemická ionizace

Vzhledem k tomu, že některé látky nelze cestou elektronové ionizace ionizovat, byla vyvinuta technika chemické ionizace, která byla poprvé popsána Munsonem a Fieldem v roce 1966. V prvním kroku je elektronovou ionizací ionizován reakční plyn nejčastěji methan, methylpropan nebo také amoniak při tlaku 10–100 Pa a energii elektronů 100–500 eV. Molekuly analytu jsou poté ionizovány produkty ionizace reakčního plynu. Například methan se ionizuje elektronovou ionizací za vzniku radikál kationtu methanu a dvou elektronů. Následně dochází ke srážce radikál kationtu s molekulou methanu za vzniku methylového radikálu a molekuly  $\text{CH}_5^+$ , případně  $\text{C}_2\text{H}_5^+$ . Po přidání vzorku dochází k reakci molekuly analytu s  $\text{CH}_5^+$  ( $\text{C}_2\text{H}_5^+$ ) za vzniku methanu (ethanu) a tzv. kvazimolekulárních iontů  $[\text{M}+1]^+$ . Kromě těchto iontů vznikají také negativní ionty  $[\text{M}-1]^-$  [20], [24], [25].

Při tomto způsobu ionizace je předáváno podstatně méně energie než při elektronové ionizaci a to je důvod, proč se tato technika řadí mezi měkké ionizační techniky. V případě chemické ionizace není možné vytvářet knihovny hmotnostních spekter přenositelné mezi různými přístroji [25].

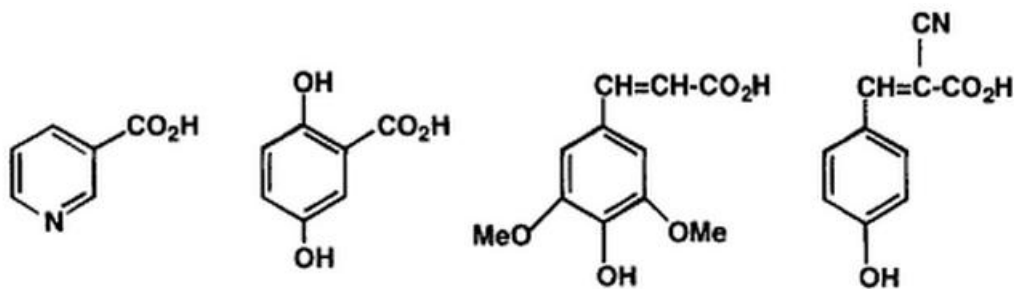
### 2.3.2.3 Desorpce a ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)

Ionizace laserem je dnes hojně rozšířenou technikou, která byla vyvinuta v Německu, ale současně a nezávisle na sobě i v Japonsku v roce 1988. Evropská verze ionizace laserem je založena na smíchání vzorku s roztokem organické matrice, čímž se usnadní desorpce a ionizace ozáření pulzy UV laseru. Naproti tomu japonská metoda používá ke stejnému účelu rozptýlený jemný kovový prášek v glycerolové matrici. Základními součástmi MALDI-TOF hmotnostního spektrometru jsou nosič vzorku, laserová optika, vysokonapěťový urychlovač, letová trubice a detektor. Schéma MALDI-TOF hmotnostního spektrometru s mikrokanálovým destičkovým detektorem (MCP) znázorňuje **Obr. 2**. Tato technika je určena pro vzorky v pevném skupenství a je vhodná pro analýzu biopolymerů a syntetických polymerů s molekulovou hmotností více než 1 MDa [25], [26].



**Obr. 2** Schéma MALDI-TOF hmotnostního spektrometru v lineárním uspořádání [26].

Při použití techniky MALDI je velmi malý objem vzorku aplikován na přesně vymezené místo na kovové desce a následně překryt stejným množstvím matrice. Kruhové prostory pro nanesení vzorku disponují hydrofobním povrchem, který zabraňuje rozšíření roztoku vzorku po větší ploše. Matrice je obvykle organická sloučenina, která je schopna absorbovat záření laseru o určité vlnové délce. Její volba při analýze je velmi důležitá, neboť vzorek musí efektivně kokrystalizovat s matricí, a proto neexistuje jedna univerzální matrice pro všechny typy analytů. Mezi nejvyžívanější matrice patří aromatické karboxylové kyseliny např. kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová, kyselina sinapová (SA), kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) nebo kyselina nikotinová (**Obr. 3**). Ionizací vzorku mohou vznikat kromě kvazimolekulárních iontů také protonované i deprotonované ionty ( $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$ ), vícenásobně nabitě ionty nebo jednou nabitě dimery i trimery [25], [27], [28].



**Obr. 3** MALDI-TOF matrice: nikotinová kyselina, 2,5-dihydroxybenzoová kyselina, sinapová kyselina a  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (v pořadí zleva doprava) [30].

Po aplikaci vzorku a matrice na desku dochází k zahájení desorpce a ionizace. Zdrojem energie pro ionizaci jsou UV-fotony emitované dusíkovým laserem o vlnové délce 337 nm a šířkou pulsu 3 ns. Energie laseru je absorbována molekulami matrice a část energie je přeměněna na energii tepelnou, která umožní odpaření části matrice a analytu. Excitované molekuly matrice pak ionizují molekuly vzorku přenosem protonu. Vzniklé ionty jsou poté urychleny díky potenciálovému rozdílu mezi MALDI-TOF deskou a vstupem do analyzátoru. Doba letu urychlených iontů analyzátozem směrem k detektoru odpovídá jejich poměru hmotnosti a náboje. Čas v nanosekundách, který uplynul mezi pulzačním zrychlením iontů a signálem, který zachytil detektor, lze přepočítat na molekulovou hmotnost jednotlivých analyzovaných molekul (např. proteinů). Detekce je obvykle provedena pomocí MCP detektoru. MALDI však nemusí vždy obsahovat analyzátor typu TOF. Existuje zapojení také s iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací (FT-ICR), iontovou pastí nebo s kvadrupólem. Kromě dusíkového laseru se využívá také infračervená radiace o vlnové délce 2,94  $\mu\text{m}$  nebo  $\text{CO}_2$  laser o vlnové délce 10,6  $\mu\text{m}$ . Technika MALDI-TOF disponuje celou řadou modifikací např. SELDI (*Surface-Enhanced Laser Desorption/ionization*), LDI (*Laser Desorption/Ionization*), NALDI (*Nanostructure-Assisted Laser Desorption/Ionization*) [25], [26], [29].

Pro více efektivní analýzu s TOF analyzátozem se používá tzv. zpožděná extrakce iontů, čímž dochází ke zvýšení rozlišení. Tato technika dokáže minimalizovat rozptyl kinetických energií iontů se stejným poměrem hmotnost/náboj, který je způsoben tím, že ionty vznikají v různé vzdálenosti od povrchu terčů na MALDI-TOF desce a tudíž nejsou urychlovány jednotně [25].

### 2.3.3 Vakuový systém

Vakuový systém je nedílnou součástí každého hmotnostního spektrometru. Nízký tlak je důležitý pro tvorbu volných elektronů a iontů v plynném stavu. Přítomnost vakua zabraňuje jakékoliv interakci iontů a neutrálních molekul, která by způsobila změnu směru dráhy letu. Pokud by však došlo ke kolizi iontů, mohl by být iont neutralizován nebo by se začal rozkládat na ionty o menší hmotnosti. Pro tvorbu nízkého vakua se používají rotační olejové vývěvy s rotujícími lamelami, které zajišťují vakuum o hodnotě  $10^{-1}$ – $10^{-2}$  Pa. Tlak par horkého oleje však může limitovat tvorbu vakua. Význam těchto čerpadel spočívá v jejich odolnosti, výkonnosti a vysoké čerpací rychlosti při vysokém tlaku. Pro vakuum od  $10^{-6}$  až  $10^{-8}$  Pa jsou vhodné turbomolekulární vývěvy a olejové difúzní vývěvy. Turbomolekulární vývěvy vykazují poruchovost díky rotující části s lopatkami. Naproti tomu difúzní vývěvy nemají žádnou pohyblivou mechanickou část a jejich poruchovost je tak nízká [24], [31].

### 2.3.4 Hmotnostní analyzátozy

Hlavní funkcí hmotnostního analyzátozu je separovat ionty produkované z iontového zdroje podle jejich poměru hmotnosti a náboje  $m/z$  (označovaný také jako efektivní hmotnost). V hmotnostním analyzátozu je přítomno vakuum, které zabraňuje vzájemným

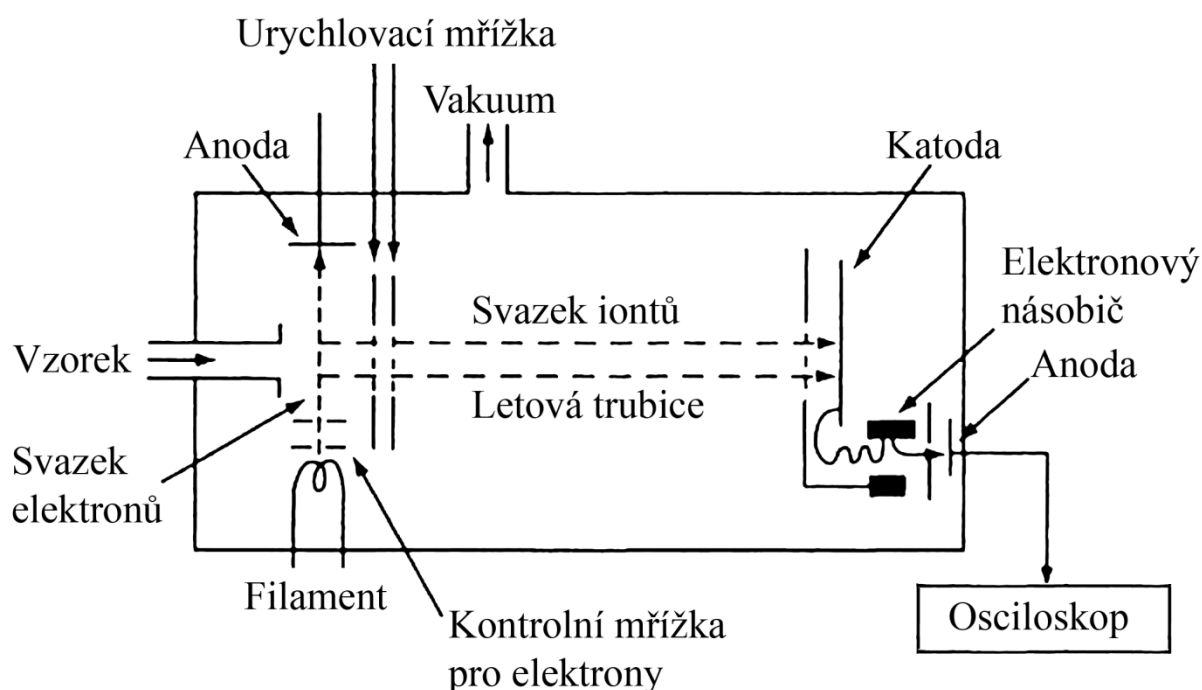
kolizím částic v plynné fázi. Energie a rychlost iontů vstupujících do analyzátoru je určena urychlujícím napětím ze štěrbiny iontového zdroje, nábojem a hmotností. [19], [21], [25].

Existuje několik druhů analyzátorů: magnetický, elektrostatický, kvadrupólový, iontová past (IT), průletový analyzátor (TOF), orbitrap, iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) a sektorové analyzátory s dvojitou fokusací (HRMS) [20], [25].

#### 2.3.4.1 Průletový analyzátor (analyzátor doby letu TOF)

Princip fungování průletového analyzátoru (*Time of flight*) spočívá v ostřelování vzorku nejprve krátkými elektronovými pulzy, poté ionty nebo laserem generovanými fotony, přičemž vznikají kladně nabitě ionty analytu. Schéma průletového analyzátoru TOF znázorňuje **Obr. 4**. Frekvence pulzů, trvajících obvykle  $0,25\ \mu\text{s}$ , je 10–50 kHz. Vzniklé kladně nabitě ionty jsou posléze urychleny elektrostatickým polem o urychlovacím napětí  $10^3$ – $10^4\ \text{V}$ . Ionty nyní vstupují do evakuované letové trubice o délce 1–2 m, kde již elektrostatické pole není. Na konci letové trubice je umístěn detektor, na který postupně dopadají ionty od nejlehčích po nejtěžší. K separaci iontů dochází podle jejich rychlosti a tedy průletového času. [19]–[22].

Zařízení se běžně používá v analyzátoch DNA sekvencí, při identifikaci proteinů, určování molárních hmotností a pro získávání informací o struktuře velkých molekul. Velmi populární technikou pro analýzu biomolekul je spojení MALDI a průletového analyzátoru označované jako MALDI-TOF MS [21], [22].



**Obr. 4** Schéma průletového analyzátoru (TOF) [22].

### 2.3.5 Detektory

Mezi nejvíce užívané detektory patří především elektronové násobiče, Faradayova cela a detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem. Tyto iontové detektory převádějí proud dopadajících iontů na proud elektronů. V případě průletového analyzátoru jsou využívány magnetické násobiče [20], [21].

Elektronové násobiče jsou tvořeny elektrodami, které zesilují elektronový proud  $10^4$ – $10^8$  krát. Konstrukce běžného násobiče odpovídá zužující se trubici, do jejíž vstupní (nejširší) části pak dopadají ionty. Dopadem iontu na stěnu trubice dochází k vyrazení elektronu, přičemž tento elektron dopadá dále na místo s méně negativním potenciálem a vyráží tak další elektrony. Takto zesílený proud elektronů je veden do zesilovače a následně vyhodnocen [21].

Faradayova cela (*Faraday cup*) je tvořena z konverzní elektrody (dynody) miskovitěho tvaru. Elektroda je obklopena klecí, která zabraňuje úniku iontů a vytvořených elektronů. Povrch elektrody je z oxidu beryllnatého nebo fosfidu gallitého. Dopadající iont způsobí vyrazení elektronu z povrchu, který posléze dopadá na anodu. Vzniklý elektrický proud je zesílen zesilovačem a vyhodnocen [21], [22].

V případě detektoru s konverzní dynodou a fotonásobičem dopadají ionty na dynodu, čímž dochází k vyrazení elektronu, který poté dopadá na fosforescenční stínítko a vyráží tak foton. Fotony jsou následně zachyceny fotonásobičem. Tento typ detektoru vykazuje vysokou citlivost a jeho nespornou výhodou je výrazně vyšší životnost (asi 5 let) oproti elektronovému násobiči (asi 1 rok) [21].

## 2.4 Identifikace mikroorganismů MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií

MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie se stala přesným a rychlým nástrojem k identifikaci grampozitivních i gramnegativních bakterií, mykobakterií, některých plísní a kvasinek. Technika je realizována s minimálními náklady a dokáže opakovaně produkovat spektra nezávislá na stáří kultury, růstových podmínkách nebo volbě kultivačního média. Jedna z nesporných výhod MALDI-TOF je schopnost analyzovat nedotčené molekuly proteinů bez jakékoliv rozsáhlé fragmentace, což umožňuje tvorbu hmotnostních spekter proteinů celého organismu. Výrazný vliv na přesnost a reprodukovatelnost získaných výsledků má příprava analyzovaného vzorku. K určení taxonomie na úrovni rodu, druhu a také variety postačuje minimální množství vzorku [32]–[34].

V současnosti narůstají požadavky na identifikaci eukaryot, především kvasinek, způsobujících závažná onemocnění často končící smrtí. Názorným příkladem je kryptokokóza, jejíž hlavní původci jsou druhy *Cryptococcus neoformans* a *Cryptococcus gatii*. Identifikace kvasinek biochemickými testy nebo analýzou DNA sekvencí je poměrně nákladnou a dlouho trvající záležitostí, která vedla k opoždění diagnóz a tím i aplikaci správné léčby. Techniky jako PCR nebo pyrosekvenování byly natolik vylepšeny, že by mohly konkurovat MALDI-TOF z hlediska rychlosti identifikace, přesto však nejsou natolik přizpůsobeny, aby mohly být zavedeny v běžných klinických mikrobiologických laboratořích [35]–[37].

V případě identifikace patogenního druhu *Cr. neoformans* je nutné rozlišovat variety *Cr. neoformans* var. *grubii* a *Cr. neoformans* var. *neoformans* (sérotyp D). Tyto dvě variety nelze diferencovat na základě polysacharidové strukturální odlišnosti. Navíc některé kmeny nemusí reagovat na sérum, které je potřebné k určení typu sérotypu. Prakticky bylo možné je rozlišit pouze na základě jejich genotypu využitím DNA sekvenční analýzy ITS oblasti (*internal transcribed spacer*) rRNA. Tato metoda však není úspěšná v případě rozlišení hlavních původců kryptokokózy – *Cr. neoformans* a *Cr. gattii* [6], [35].

Princip identifikace mikroorganismů MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií je založen na porovnání profilů hmotnostních spekter jejich exprimovaných intracelulárních proteinů. Tyto proteiny jsou vyextrahovány z vnitřního obsahu buňky organickým rozpouštědlem obsaženým v roztoku matrice. Takto získané proteiny jsou především ribozomální a jsou přítomny v poměrně vysokých koncentracích. Protože je hmotnostní spektrum specifické pro daný druh až varietu, lze mluvit o tzv. molekulárním otisku prstů (*molecular fingerprint*). Neznámé mikroorganismy jsou identifikovány právě na základě porovnání tohoto „otisku prstů“ se všemi vzorovými spektry v databázích [29], [38].

Firma Bruker Daltonik, jakožto jeden z předních výrobců hmotnostních spektrometrů a jiné analytické techniky, vytvořila specifický algoritmus pro vyhodnocení naměřených hmotnostních spekter mikroorganismů. Srovnávací algoritmus vypočte tři separované hodnoty pro tři základní charakteristiky naměřeného a referenčního hmotnostního spektra definovaného mikroorganismu v databázi [38].

- Vyhodnocení počtu shodných signálů v referenčním a naměřeném spektru. Žádným shodným signálům odpovídá hodnota 0. Kompletní shodě naopak odpovídá hodnota 1 [38].
- Vyhodnocení počtu blízkých signálů v referenčním a naměřeném spektru. Žádným blízkým signálům odpovídá hodnota 0, kompletní shodě odpovídá hodnota 1 [38].
- Výpočet symetrie shodných signálních párů. Pokud korespondují vysoce intenzivní signály v naměřeném spektru s těmito signály v referenčním spektru a totéž platí pro méně intenzivní signály, nabývá symetrie hodnoty 1, pokud však signální páry nevykazují symetrii, nabývá symetrie hodnoty 0 [38].

Tyto tři získané hodnoty jsou vzájemně vynásobené a výsledek je normalizovaný na 1000. Hodnota skóre je dekadický logaritmus získaného normalizovaného výsledku. Maximální skóre může tedy dosáhnout hodnoty 3, což je dekadický logaritmus 1000 (= log 1000). Čím vyšší je získané skóre, tím vyšší je pravděpodobnost správné klasifikace druhů. Hodnoty rozsahů skóre a jejich interpretaci znázorňuje **Tab. 1** [38].

**Tab. 1** Hodnoty rozsahu skóre pro identifikaci mikroorganismů [39].

| Rozsah      | Interpretace                    | Symbole | Barva   |
|-------------|---------------------------------|---------|---------|
| 2.000–3.000 | Vysoká správnost identifikace   | (+++)   | zelená  |
| 1.700–1.999 | Nízká správnost identifikace    | (+)     | žlutá   |
| 0.000–1.699 | Identifikaci není možné provést | (–)     | červená |

### 3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem bakalářské práce bylo otestovat nejvhodnější metodu přípravy a aplikace vzorku a najít nejvhodnější kultivační médium pro biotypizaci vybraných druhů kvasinek rodu *Cryptococcus* pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

Veškerá naměřená spektra vybraných druhů kvasinek byla poskytnuta Sbírce kultur kvasinek jako referenční spektra pro alternativní a rychlou identifikaci nových izolátů.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Seznam použitých kmenů kvasinek rodu *Cryptococcus*

**Tab. 2** Sekvenované kmeny (D1/D2 LSU rRNA).

| Sbírkové označení kmene | Druh                                                  |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|
| CCY 17-1-4              | <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> |
| CCY 17-1-5              | <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> |
| CCY 17-3-2              | <i>Cryptococcus laurentii</i> – typový                |
| CCY 17-3-5              | <i>Cryptococcus flavus</i>                            |
| CCY 17-3-13             | <i>Cryptococcus carnescens</i>                        |
| CCY 17-3-35             | <i>Bulleromyces albus</i>                             |
| CCY 17-4-1              | <i>Cryptococcus albidus</i>                           |
| CCY 17-4-2              | <i>Cryptococcus saitoi</i>                            |
| CCY 17-4-39             | <i>Cryptococcus magnus</i>                            |
| CCY 17-5-1              | <i>Cryptococcus gastricus</i>                         |
| CCY 17-8-1              | <i>Cryptococcus terreus</i>                           |
| CCY 17-19-3             | <i>Cryptococcus macerans</i>                          |
| CCY 17-25-1             | <i>Cryptococcus aerius</i>                            |
| nezařazen               | <i>Cryptococcus diffluens</i>                         |

**Tab. 3** Nesekvenované kmeny (N), nebo nejednoznačný výsledek sekvenování (/).

| Sbírkové označení kmene | Předpokládaný druh                       |
|-------------------------|------------------------------------------|
| CCY 17-3-18             | <i>Cryptococcus saitoi/friedmanni</i>    |
| CCY 17-3-26             | <i>Cryptococcus victoriae/tephrensis</i> |
| CCY 17-3-28             | <i>Cryptococcus flavescens</i> (N)       |
| CCY 17-3-30             | <i>Cryptococcus flavescens</i> (N)       |
| CCY 17-3-36             | <i>Bulleromyces albus</i> (N)            |
| CCY 17-4-9              | <i>Cryptococcus aerius</i> (N)           |
| CCY 17-4-13             | <i>Cryptococcus diffluens</i> (N)        |
| CCY 17-4-40             | <i>Cryptococcus magnus</i> (N)           |

### 4.2 Použité přístroje a chemikálie

#### 4.2.1 Použité přístroje a příslušenství

Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme, firma: Bruker Daltonik GmbH, SRN s MTP 384 Target Plate Polished Steel TF, firma: Bruker Daltonik GmbH, SRN  
Laminární box Telstar Biostar, firma: Telstar, Španělsko  
Centrifuga Eppendorf MiniSpin, firma: Eppendorf AG, SRN

Vortex mixer K (VM-300), firma: GEMMY INDUSTRIAL CORPORATION, Taiwan  
Analytické váhy ABT 120-4M, firma: Kern & Sohn GmbH, SRN  
Předvážky PLE 200-3, firma: Kern & Sohn GmbH, SRN  
Mikropipety Eppendorf research (100–1000 µl, 10–100 µl), firma: Eppendorf AG, SRN  
Mikropipeta Autoclavable Nichipet EX (0,1–2 µl), firma: NICHIRYO CO., LTD., Japonsko  
Stopky Oregon Scientific, firma: Oregon Scientific, Inc., USA  
PC HP Z400 Workstation, firma: HP, Palo Alto, USA  
Špičky na pipetování, firma: Sarstedt, SRN  
Mikrozkumavky, firma: Sarstedt a Eppendorf AG, SRN  
Očkovací klíčky

#### **4.2.2 Použité chemikálie**

Bramborový agar, firma: Merck KGaA, SRN  
Glukóza, firma: Slavus, Slovenská republika  
Pepton, firma: Difco Laboratories, USA  
Agar, firma: Merck KGaA, SRN  
Kvasničný extrakt, firma: Merck KGaA, SRN  
Kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová (Matrix substance for Maldi-MS,  $\geq 99\%$ , HPLC), firma: Fluka analytical, Sigma Aldrich, Nizozemí  
Acetonitril (pro HPLC), firma: Merck KGaA, SRN  
Kyselina trifluoroctová (pro syntézu), firma: Merck, KGaA, Schuchardt, Hohenbrunn, SRN  
Kyselina ferulová (trans-ferulic acid), firma: Fluka analytical, Sigma Aldrich, Nizozemí  
Kyselina sinapová (Matrix substance for Maldi-MS,  $\geq 99\%$ , (T)), firma: Fluka analytical, Sigma Aldrich, Nizozemí  
Kyselina mravenčí (pro analýzu 98–100%), Merck, KGaA, Schuchardt, SRN  
Ethanol (Gradient grade for liquid chromatography), firma: Merck, KGaA, Schuchardt, SRN  
Cytochrom C, firma: Sigma-Aldrich, Nizozemí  
Destilovaná voda

### **4.3 Příprava kultivačních médií**

#### **4.3.1 Příprava bramborového agaru (ZA)**

Na předvážkách bylo odváženo 39 g bramborového agaru. Do Erlenmeyerovy baňky s 1 litrem destilované vody bylo přidáno navážené množství agaru. Hrdlo baňky bylo opatřeno hliníkovou folií. Směs byla zahřívána ve vodní lázni, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agaru. Roztok byl sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Připravené médium bylo nadávkováno do zkumavek a tzv. „našikmeno na tyčince“. Poté byly zkumavky s médiem uskladněny v suchém a bezprašném prostředí při teplotě 4–6 °C.

#### 4.3.2 Příprava YPD média (Yeast pepton dextrose)

Do Erlenmeyerovy baňky s 300 ml destilované vody bylo přidáno 6 g glukózy, 6 g peptonu, 6 g agaru a 3 g kvasničného extraktu. Hrdlo Erlenmeyerovy baňky bylo obaleno hliníkovou folií. Směs byla povařena ve vodní lázni přibližně 30–45 minut. Roztok byl umístěn do autoklávu a sterilován při teplotě 121 °C po dobu 60 minut. Stejně jako v případě bramborového agaru, tak i YPD médium bylo „našikmeno na tyčince“ a uskladněno za stejných podmínek.

#### 4.3.3 Příprava Sabouraudova agaru (SA)

Na předvážkách bylo naváženo 2,5 g peptonu, 10 g glukózy a 5 g agaru. Navážené chemikálie byly přidány ke 250 ml destilované vody v Erlenmeyerově baňce. Pomocí kyseliny chlorovodíkové bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 5,6. Dávkování média do zkumavek a jejich uskladnění bylo provedeno analogicky jako u ZA a YPD média.

#### 4.4 Inokulace kvasinek rodu *Cryptococcus*

Očkovací kličkou byly naočkovány kmeny kvasinek z původního média – sladiny na tři nově připravená media (ZA, YPD, SA). Očkovací box byl nejprve sterilován UV zářením po dobu 20 minut. Před samotným odběrem vzorku bylo nutné zachovat sterilitu prostředí, tudíž byla očkovací klička pečlivě vyžihána v plameni kahanu. Poté byl z původní zkumavky odebrán vzorek mikroorganismů a jemnými krouživými pohyby byl aplikován na připravené médium, aniž by došlo k porušení povrchu média. Při každém očkovaní nového kmene byla očkovací klička několikrát sterilována v plameni z důvodu možné kontaminace vzorku jinými kmeny kvasinek. Po naočkování každého kmene byly v plameni kahanu sterilovány také zátky z buničité vaty. Tento postup byl použit pro všechny tři typy médií a celkem 22 kmenů kvasinek.

#### 4.5 Kultivace kvasinek rodu *Cryptococcus*

Veškeré kmeny kvasinek rodu *Cryptococcus*, naočkované na třech připravených médiích, byly kultivovány celkem 4 dny při teplotě 20 °C.

#### 4.6 Příprava matric pro MALDI-TOF MS

##### 4.6.1 Příprava matrice č. 1 (CHCA)

Byl připraven 10% roztok kyseliny trifluoroctové v destilované vodě. Množství 10 mg kyseliny  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicové bylo rozpuštěno ve směsi složené z 500  $\mu$ l 100% acetonitrilu, 250  $\mu$ l 10% kyseliny trifluoroctové a 250  $\mu$ l destilované vody. Připravená matrice byla uskladněna v chladničce.

#### **4.6.2 Příprava matrice č. 2 (SAFA)**

Do dvou mikrozkuavek typu Eppendorf bylo na analytických váhách odváženo 10 mg kyseliny ferulové (FA) a 30 mg kyseliny sinapové (SA). Obě kyseliny byly rozpuštěny ve směsi složené z 500 µl 100% acetonitrilu, 250 µl 10% kyseliny trifluoroctové a 250 µl destilované vody. Roztoky kyseliny sinapové a ferulové byly smíchány v poměru 1:1. Připravená matrice byla uskladněna v chladničce.

#### **4.7 Metody přípravy a aplikace vzorku na MALDI-TOF desku**

##### **4.7.1 Metoda přípravy a aplikace vzorku dle firmy Bruker (Metoda č. 1, EtOH-CHCA)**

Do mikrozkuavek typu Eppendorf bylo nadávkováno 300 µl destilované vody. V laminárním boxu byly inokulační kličkou odebrány do těchto mikrozkuavek vzorky kvasinek. Suspenze kvasinek byla důkladně promíchána pomocí Vortex mixéru a ke každému vzorku bylo přidáno 900 µl ethanolu. Vzorky se nechaly odstředit 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Vzniklý supernatant byl odebrán a vzorky se opětovně nechaly odstředit 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Poté byl odebrán mikropipetou zbylý supernatant. Při každém odběru bylo nutné přísně dodržovat pravidla aseptické práce, aby se zamezilo případné kontaminaci vzorků. K sedimentu v mikrozkuavkách bylo přidáno 100 µl 70% kyseliny mravenčí a celá směs byla důkladně promíchána na Vortex mixéru. Jakmile bylo ke vzorkům přidáno 100 µl 100% acetonitrilu, byly spuštěny stopky a vzorky se nechaly stát po dobu 30 minut.

Po uplynutí této doby byly mikrozkuavky vloženy do centrifugy na dobu 5 minut při otáčkách 10 000 za minutu. Mikropipetou byl nanesen 1 µl supernatantu každého vzorku na MALDI-TOF desku na přesně vyznačenou polohu. Po zaschnutí skvrn na desce při laboratorní teplotě byly jednotlivé vzorky překryty 1 µl již předem připravené matrice č. 1 (CHCA) a opět se nechaly při laboratorní teplotě zaschnout [38].

##### **4.7.2 Kombinovaná metoda přípravy a aplikace vzorku (Metoda č. 2, EtOH-SAFA)**

Metoda č. 2 byla provedena identickým způsobem jako Metoda č. 1, liší se však v matrici použité k překrytí vzorku na MALDI-TOF desce. V případě této metody byla použita matrice č. 2 (směs roztoků kyseliny sinapové a ferulové v poměru 1:1) [38].

##### **4.7.3 Metoda přípravy a aplikace vzorku vypracovaná pro rod *Cryptococcus* rostoucí na sladině (Metoda č. 3, H<sub>2</sub>O-SAFA)**

Do mikrozkuavek typu Eppendorf bylo nadávkováno mikropipetou 1000 µl destilované vody. V laminárním boxu byly sterilní inokulační kličkou odebrány vzorky kmenů kvasinek, které byly umístěny do připravených mikrozkuavek. Vzorky se nechaly odstředit 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Mikropipetou byl odebrán supernatant a k sedimentu byl

přidán 1 ml destilované vody. Tento postup purifikace vzorků byl opakován celkem sedmkrát.

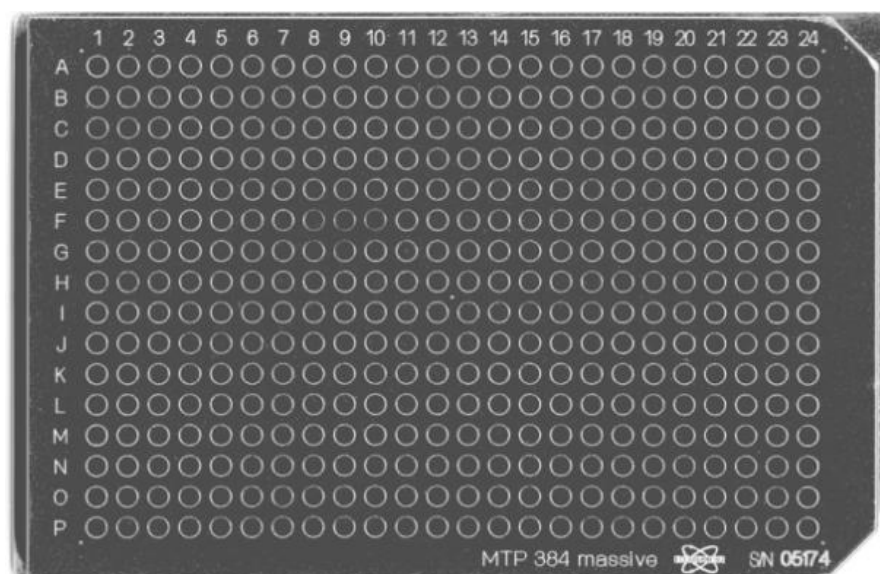
Po skončení promývání vzorku byl odpipetován supernatant a k sedimentu bylo přidáno 50  $\mu$ l matrice č. 2 (směs roztoků kyseliny sinapové a ferulové v poměru 1:1). Vzorky byly promíchány pomocí Vortex mixéru a nechaly se stát po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byly zcentrifugovány po dobu 5 minut a při otáčkách 10 000 za minutu. Mikropipetou byl nanesen 1  $\mu$ l supernatantu každého vzorku na přesně danou pozici na MALDI-TOF desce. Po nanesení na desku se nechaly vzorky zaschnout při laboratorní teplotě.

#### 4.8 Analýza proteinů MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií

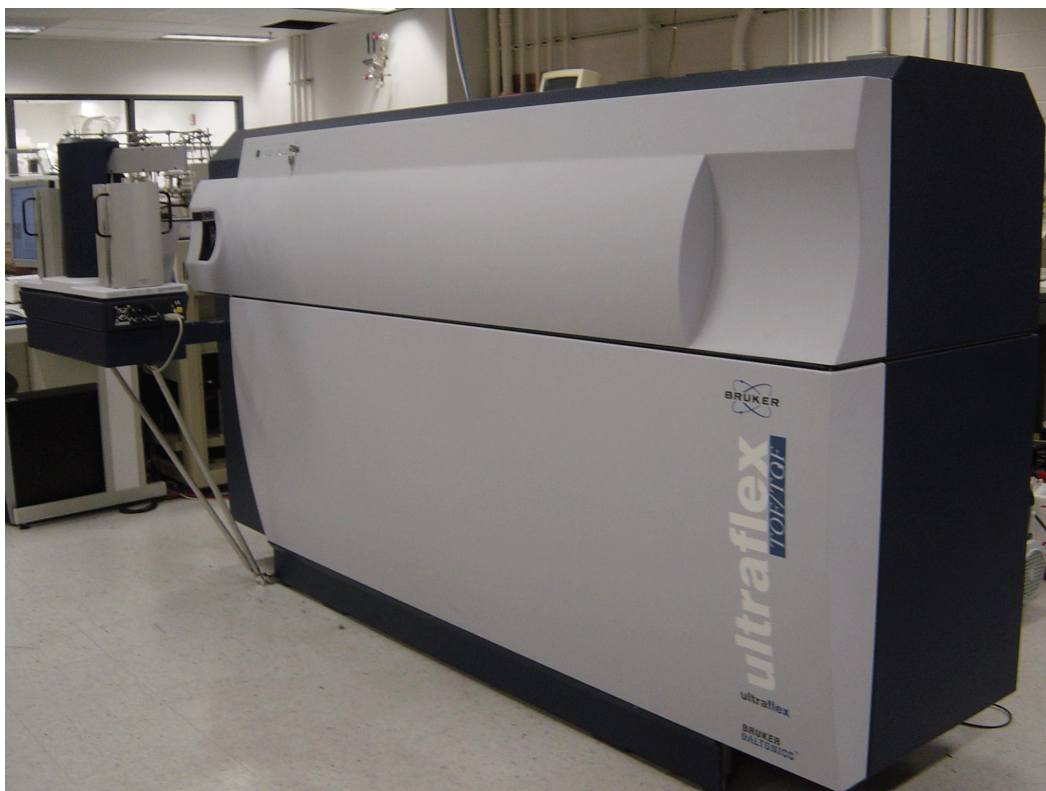
K měření celkem 22 kmenů kvasinek rostoucích na třech různých médiích byl použit hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme a MALDI-TOF deska MTP 384 Target Plate Polished Steel TF od firmy Bruker Daltonik. Technické parametry tohoto hmotnostního spektrometru obsahuje **Tab. 4**. MALDI-TOF deska MTP 384 Target Plate Polished Steel TF a samotný přístroj MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme jsou znázorněny na **Obr. 5** a **Obr. 6**.

**Tab. 4** Technické parametry hmotnostního spektrometru MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme.

|                |                                     |                                                                                                                                  |
|----------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MALDI TOF/TOF  | Iontový zdroj                       | Bezmřížkový s PAN II <sup>TM</sup> technologií                                                                                   |
|                | Laser (Smartbeam II <sup>TM</sup> ) | Vlnová délka: 355 nm<br>Max. frekvence: 2000 Hz<br>Použitá frekvence: 1000 Hz<br>Napětí: 25 kV<br>Počet výstřelů na vzorek: 1000 |
| TOF analyzátor | Letová trubice                      | Délka trubice: 182 cm<br>Horizontální uspořádání                                                                                 |
|                | Hmotnostní rozsah                   | 2 000-22 000 Da                                                                                                                  |



**Obr. 5** MALDI-TOF deska MTP 384 Target Plate Polished Steel TF.



*Obr. 6 Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme [40].*

#### **4.9 Kalibrace zařízení**

Před vlastním měřením vzorků kvasinek bylo nezbytné provést kalibraci zařízení. Jako standard byl použit Cytochrom C (Sigma-Aldrich).

#### **4.10 Měření na zařízení MALDI TOF/TOF**

Připravená MALDI-TOF deska se vzorky byla vložena do hmotnostního spektrometru. Měření proběhlo pomocí programu Flexcontrol-Ultraflex TOF/TOF v lineárně pozitivním módu (LP MID). Před zahájením měření bylo nutné provést kalibraci zařízení a nastavit veškeré parametry analýzy (intenzita laseru atd.). Kurzorem byla zvolena pozice vzorku na desce. Při detailním pohledu na vzorek bylo vybráno konkrétní místo nástřelu laseru.

V případě, že získané spektrum nebylo vyhovující, bylo vybráno jiné místo ve vzorku nebo byla případně upravena intenzita laseru. Naměřená hmotnostní spektra byla uložena do příslušné složky v PC.

#### **4.11 Software pro vyhodnocení naměřených dat**

Naměřená hmotnostní spektra byla vyhodnocena programem Maldi Biotyper 3.0 (Software for microorganism identification and classification, Bruker Daltonik GmbH) a mMass 5.5.0.

V Maldi Biotyper 3.0 byla spektra normalizována a vyhodnocena podle specifického algoritmu. Z normalizovaných spekter pak byly sestaveny výsledné dendrogramy. Spektra byla porovnána na základě dvou kritérií – kultivačního média a metody pro přípravu a aplikaci vzorku na MALDI-TOF desku.

V menším měřítku byl použit také program mMass 5.5.0. Tímto softwarem byla upravena spektra, která posloužila jako model pro porovnání ideálního a nevhodného spektra v základní i normalizované podobě.

#### **4.12 Sekvenční analýza D1/D2 domén LSU rRNA genu**

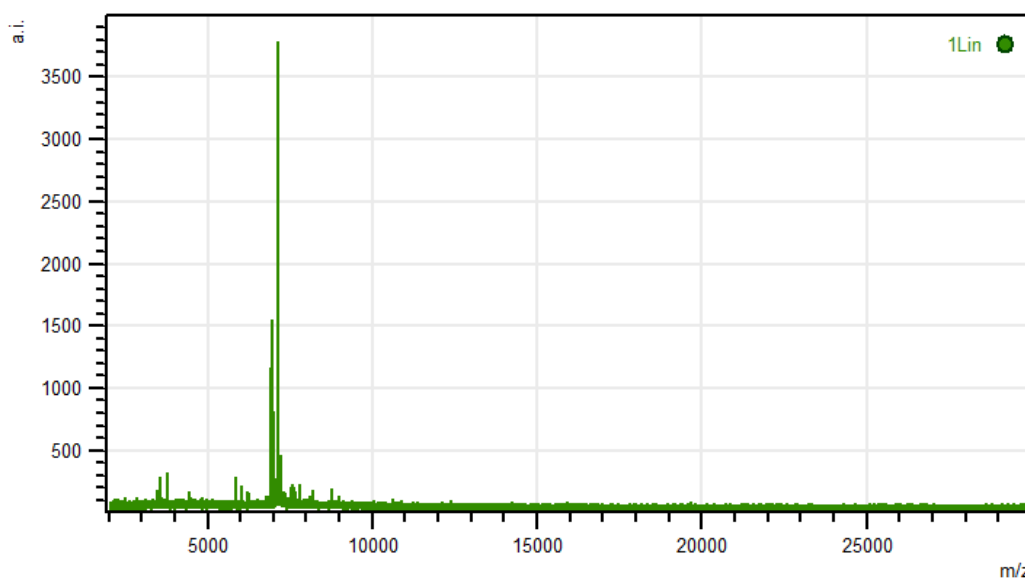
Kmeny kvasinek rodu *Cryptococcus* uvedené v **Tab. 2** byly podrobeny sekvenční analýze D1/D2 domén LSU rRNA genu, která byla provedena pracovníky Sbírký kultur kvasinek podle příslušného manuálu (Kurtzman, 1997) [41].

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

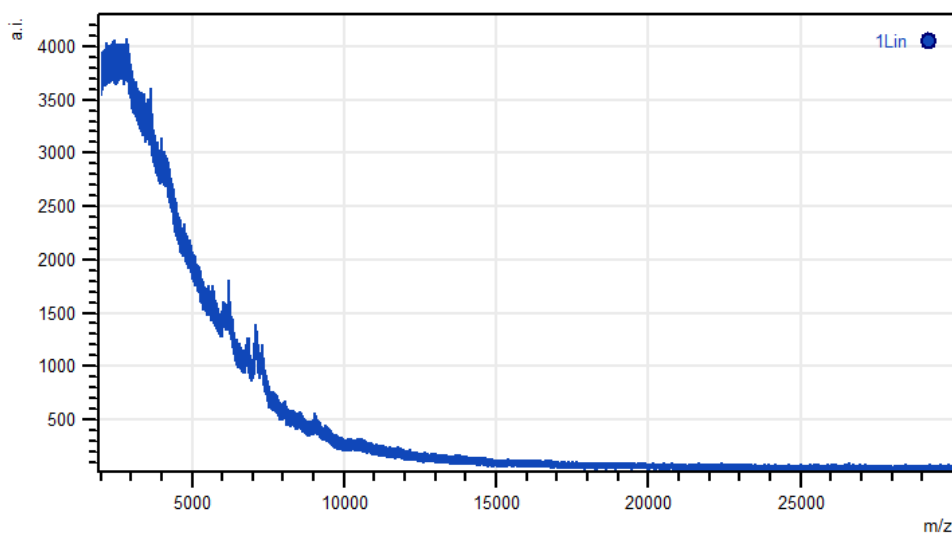
### 5.1 Vyhodnocení hmotnostních spekter kvasinek rodu *Cryptococcus*

Ke kultivaci kvasinek rodu *Cryptococcus* byla použita celkem tři kultivační média – YPD, bramborový a Sabouraudův agar. Porovnání jednotlivých kmenů probíhalo tak, že pro všechny kmeny kvasinek kultivované na zvoleném živném médiu byly provedeny tři metody úpravy a aplikace vzorku na MALDI-TOF desku. Metoda č. 2 (EtOH-SAFA) byla označena jako modelová metoda a byla tedy porovnána s metodou č. 1 (EtOH-CHCA) a metodou č. 3 (H<sub>2</sub>O-SAFA). Naměřená spektra by měla pro správnou identifikaci obsahovat pouze charakteristické píky a minimum šumu na pozadí. Ne ve všech případech ovšem byla získána ideální spektra, neboť některá spektra vykazovala na pozadí značný šum a tím nevynikly píky potřebné pro identifikaci. Měření některých spekter bylo opakováno s jinou intenzitou dusíkového laseru nebo zaměřením laseru na jiné místo vzorku na MALDI-TOF desce. Přesto však intenzita šumu výsledných spekter nebyla v některých případech nižší. Důvod vzniku takovýchto spekter připisují hlavně tvorbě extracelulárních polysacharidů a silnostěnné kapsule typické pro rod *Cryptococcus*. Porovnání ideálního a nevhodného spektra zobrazeného programem mMass 5.5.0. znázorňuje **Obr. 7** a **Obr. 8**.

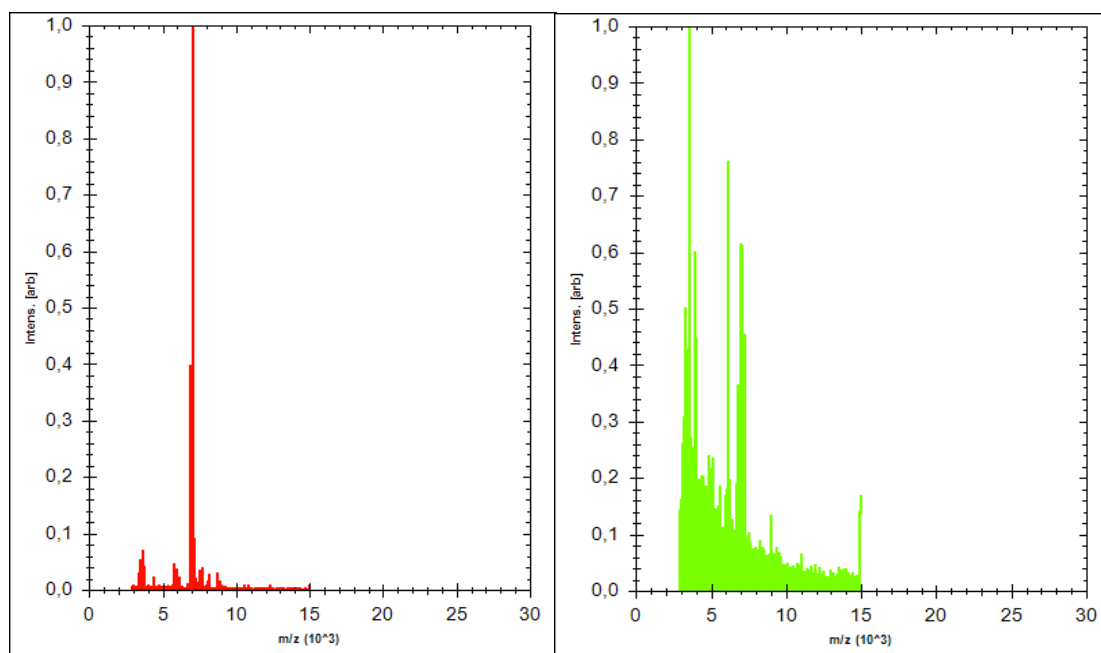
V případě, že by nevhodné spektrum (**Obr. 8**) bylo automaticky normalizované programem Maldi Biotyper 3.0, může být navrhnuo zdánlivě vhodné spektrum a dojít ke zkreslení výsledku (**Obr. 9**). Z tohoto důvodu je v případě rodu *Cryptococcus* nutné manuálně posoudit kvalitu naměřených spekter, nekvalitní spektra vyřadit a až poté normalizovat zbylá spektra programem Maldi Biotyper 3.0.



**Obr. 7** Ideální hmotnostní spektrum kmene CCY 17-5-1, kultivace na YPD médiu, úprava a aplikace vzorku metodou č. 3 (program mMass 5.5.0).



**Obr. 8** Nevhodné hmotnostní spektrum kmene CCY 17-5-1, kultivace na YPD médiu, úprava a aplikace vzorku metodou č. 1 (program mMass 5.5.0).



**Obr. 9** Ideální normalizované hmotnostní spektrum kmene CCY 17-5-1, kultivace na YPD médiu, úprava a aplikace vzorku metodou č. 3 (vlevo); nevhodné normalizované hmotnostní spektrum kmene CCY 17-5-1, kultivace na YPD, úprava a aplikace vzorku metodou č. 1 (vpravo);(program Maldi Biotyper 3.0).

## 5.2 Vliv kultivačního média, metody a aplikace vzorku na kvalitu hmotnostních spekter kvasinek

V případě vyhodnocení hmotnostních spekter kvasinek rodu *Cryptococcus*, z hlediska vlivu média, metod aplikace a úpravy vzorku, je nutné zohlednit několik faktorů:

- Volba použitého kultivačního média
- Způsob promývání vzorku

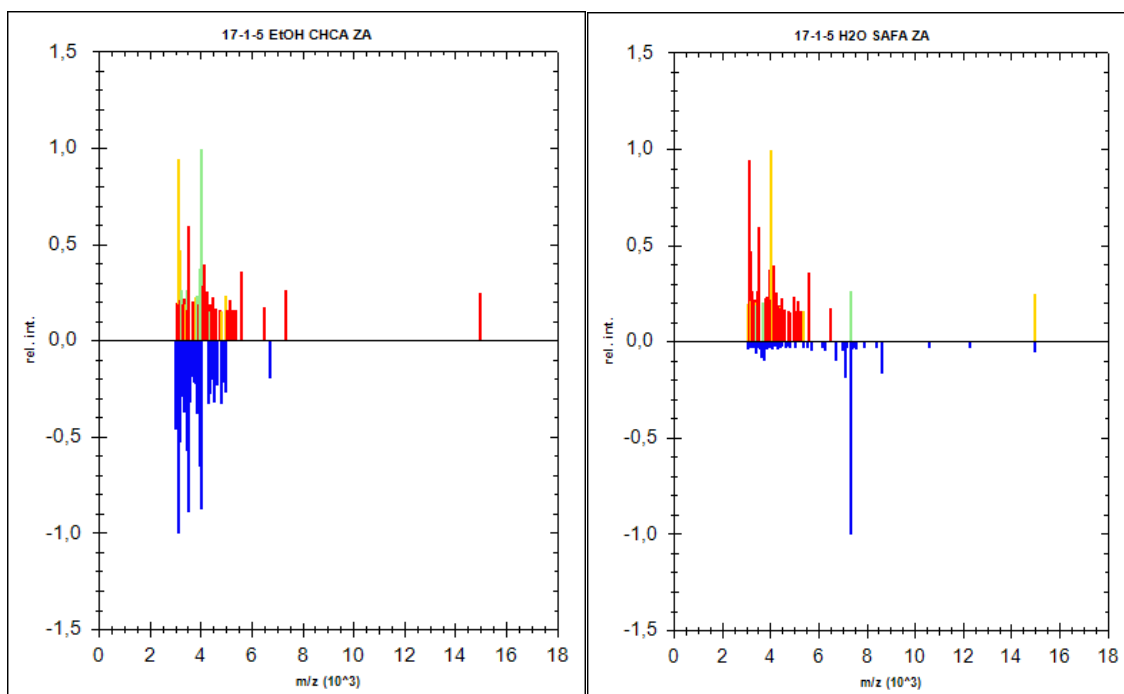
- Volba a koncentrace extrakčního činidla\*
- Doba extrakce proteinů
- Volba a koncentrace roztoku matrice
- Způsob nanesení vzorku na MALDI-TOF desku

\* v některých případech se jako extrakční činidlo používá matrice

Všechna tato kritéria mají podstatný vliv na výsledný vzhled jednotlivých spekter a hodnotu skóre. Jako vzorový druh pro ukázkou vlivu použitých kultivačních médií a metod úpravy a aplikace vzorku byl vybrán *Cr. neoformans* kmen CCY 17-1-5. Níže jsou zobrazena spektra pro všechny tři kultivační média a tři metody úpravy a aplikace vzorku.

Naměřená hmotnostní spektra pro kmen CCY 17-1-5, který byl kultivován na bramborovém agaru, znázorňuje **Obr. 10**. Na obrázku vlevo byl vzorek upraven metodou č. 1 (EtOH-CHCA) a porovnán s metodou č. 2 (EtOH-SAFA, směřující směrem nahoru). Na obrázku vpravo byl vzorek kmene upraven metodou č. 3 (H<sub>2</sub>O-SAFA) a porovnán opět s metodou č. 2 (EtOH-SAFA, směřující směrem nahoru).

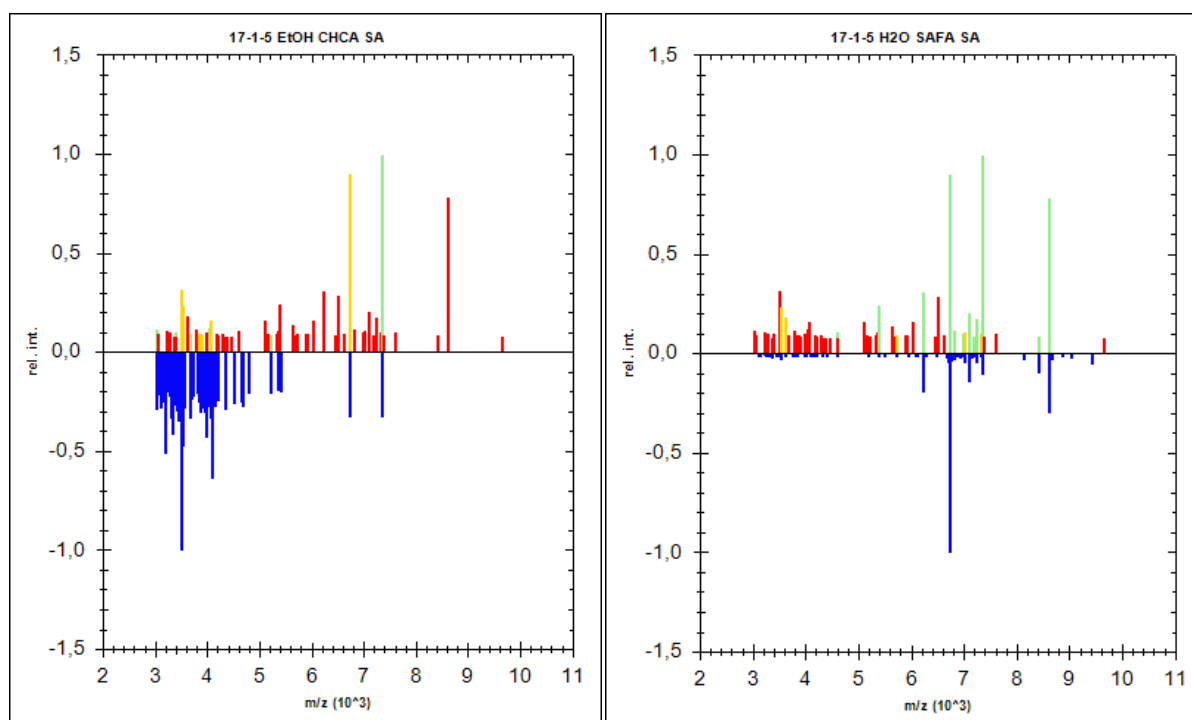
Na první pohled je patrné, že spektra získaná různou přípravou vzorku jednoho kmene rostoucího na tom samém médiu, nevykazují příliš vysokou shodu, a proto jsou jejich výsledná skóre poměrně nízká. V prvním případě (obrázek vlevo) nabývalo skóre hodnoty 1,471. V druhém případě bylo získané skóre 0,622. Obě hodnoty skóre spadají do rozmezí 0,000–1,699, a tudíž by nebylo možné daný mikroorganismus identifikovat. Spektra pro identifikaci kmenů kvasinek kultivovaných na bramborovém agaru nebyla všeobecně kvalitní, a proto byla pro další práci vyloučena.



**Obr. 10** Hmotnostní spektra kmene CCY 17-1-5 kultivovaného na bramborovém agaru, úprava a aplikace vzorku metodou č. 1 (vlevo dolů) a úprava a aplikace metodou č. 3 (vpravo dolů) v porovnání s úpravou a aplikací vzorku metodou č. 2 (nahoru).

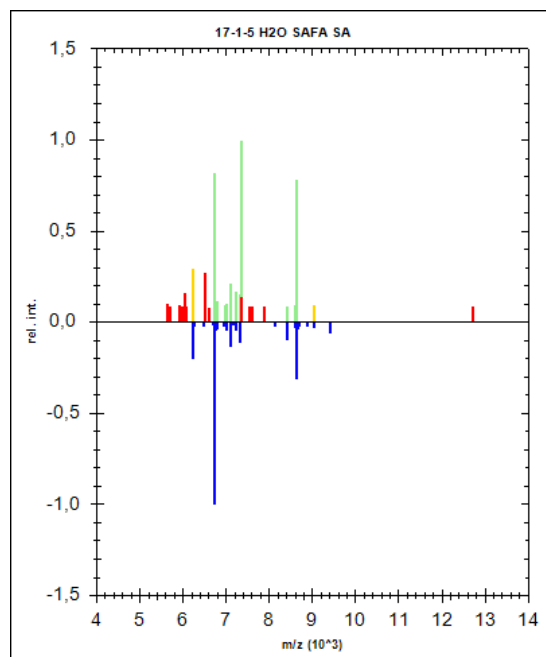
Pro kmen CCY 17-1-5, kultivovaný na Sabouraudově agaru, jsou hmotnostní spektra znázorněna na **Obr. 11**. Obrázek vlevo ukazuje srovnání metody č. 2 (EtOH-SAFA, směřující směrem nahoru) a metody č. 1 (EtOH-CHCA). Na obrázku vpravo je vyobrazeno porovnání metody č. 2 (EtOH-SAFA, směřující směrem nahoru) a metody č. 3 (H<sub>2</sub>O-SAFA). Spektrum vyobrazené na obrázku vlevo vykazovalo skóre pouze o hodnotě 0,913, a tudíž bylo označeno jako nevhodné.

Skóre spektra, vyobrazeného na obrázku vpravo, dosáhlo hodnoty 1,986. Tato hodnota skóre spadá do rozmezí 1,700–1,999 a lze tedy daný mikroorganismus identifikovat, avšak ne stále s vysokou přesností. Obě vyobrazená spektra byla vyhodnocena programem Maldi Biotyper 3.0 bez jakékoliv úpravy šumu na pozadí nebo rozsahu m/z.



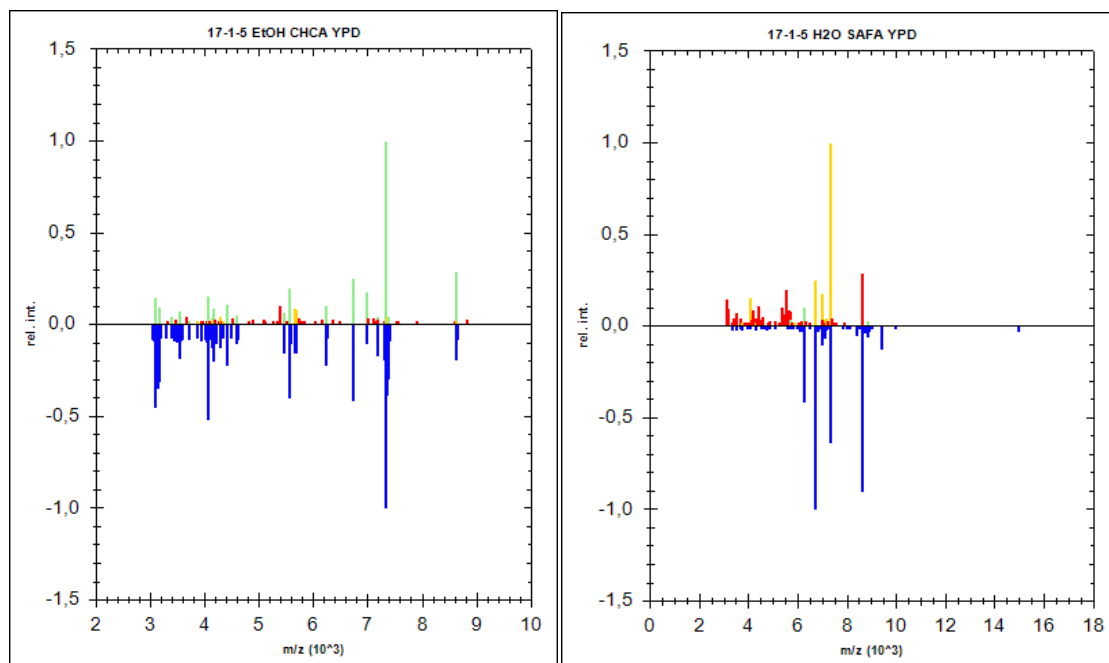
**Obr. 11** Hmotnostní spektra kmene CCY 17-1-5 kultivovaného na Sabouraudově agaru, úprava a aplikace vzorku metodou č. 1 (vlevo dolů) a úprava a aplikace metodou č. 3 (vpravo dolů) v porovnání s úpravou a aplikací vzorku metodou č. 2 (nahoru).

Spektrum znázorněné na **Obr. 12** zobrazuje porovnání metody č. 2 (EtOH-SAFA, směřující směrem nahoru) a metody č. 3 (H<sub>2</sub>O-SAFA). V programu Maldi Biotyper 3.0. bylo toto spektrum vyhlazeno a byl také změněn rozsah m/z porovnávaných proteinů, aby se co nejvíce eliminovala přítomnost zbytku polysacharidů. Získané spektrum disponovalo výrazně vyšším skóre než původní neupravené. Skóre dosáhlo hodnoty 2,137, která se nachází v intervalu pro jednoznačnou a správnou identifikaci mikroorganismů. V tomto případě tedy nesehrál způsob promývání vzorku tak velikou úlohu, jako použité extrakční činidlo a rozsah měření ve spojení s použitou maticí.



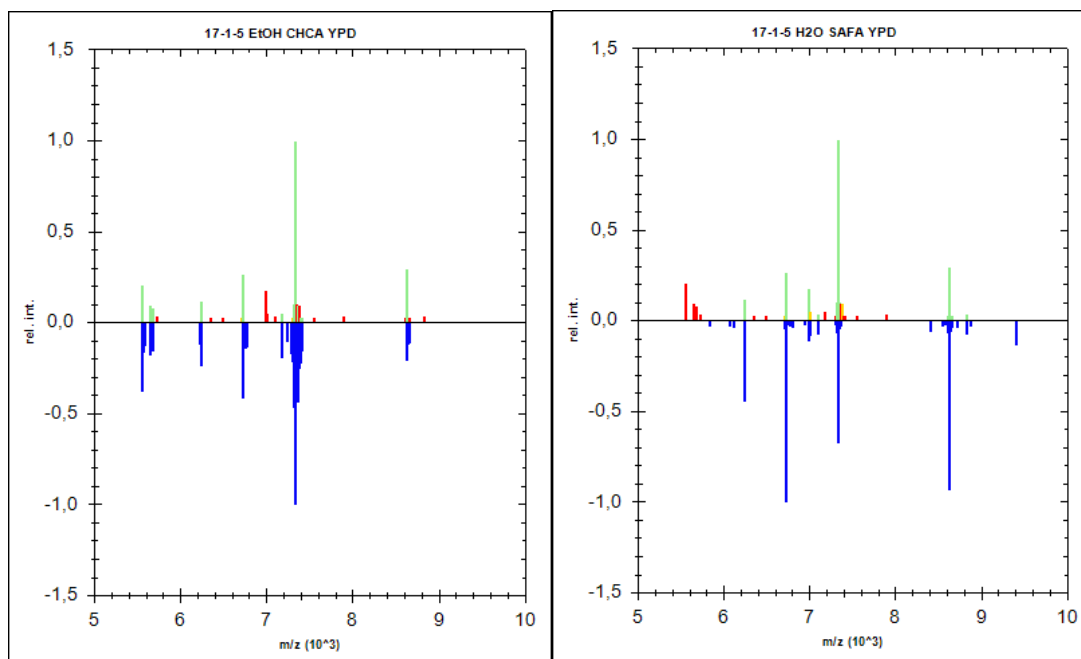
**Obr. 12** Hmotnostní spektrum kmene CCY 17-1-5, kultivace na Sabouraudově agaru, úprava a aplikace vzorku metodou č. 3 a č. 2 (úprava v programu Maldi Biotyper 3.0).

Na **Obr. 13** jsou vyobrazena hmotnostní spektra pro kmen CCY 17-1-5, který byl kultivován na YPD médiu. Jako referenční spektrum (směřující směrem vzhůru) byla zvolena opět metoda č. 2 (EtOH-SAFA). Obrázek vlevo znázorňuje porovnání metody č. 2 a metody č. 1 (EtOH-CHCA) se skóre 1,986. Naproti tomu obrázek vpravo vyobrazuje porovnání metody č. 2 a metody č. 3 (H<sub>2</sub>O-SAFA) se skóre 0,979, což je nevhodné a nedostačující k jednoznačné identifikaci kmene kvasinek.



**Obr. 13** Hmotnostní spektra kmene CCY 17-1-5 kultivovaného na YPD médiu, úprava a aplikace vzorku metodou č. 1 (vlevo dolů) a úprava a aplikace metodou č. 3 (vpravo dolů) v porovnání s úpravou a aplikací vzorku metodou č. 2 (nahoru).

Následující spektra, znázorněná na **Obr. 14**, byla upravena v programu Maldi Biotyper 3.0 vyhlazením surových spekter a změnou rozsahu m/z porovnávaných proteinů. Takto upravená spektra vykazují mnohem vyšší skóre než spektra původní. Obrázek umístěný vlevo ukazuje porovnání metody č. 2 (EtOH-SAFA) a metody č. 1 (EtOH-CHCA) s hodnotou skóre 2,254. Obrázek vpravo znázorňuje porovnání metody č. 2 (EtOH-SAFA) a metody č. 3 (H<sub>2</sub>O-SAFA) se skóre 2,173. Obě hodnoty skóre patří do intervalu, kdy lze jednoznačně a správně identifikovat daný mikroorganismus.



**Obr. 14** Hmotnostní spektra kmene CCY 17-1-5 kultivovaného na YPD médiu upravena v programu Maldi Biotyper 3.0, úprava a aplikace vzorku metodou č. 1 (vlevo dolů) a úprava a aplikace metodou č. 3 (vpravo dolů) v porovnání s úpravou a aplikací vzorku metodou č. 2 (nahoru).

Následující tabulka zobrazuje procentuální vyjádření získaných vhodných spekter pro identifikaci 22 kmenů kvasinek rodu *Cryptococcus* (**Tab. 5**). Metoda č. 3 (H<sub>2</sub>O-SAFA), která byla popsána jako nejvhodnější pro kultivace na sladidovém agaru [42], dosáhla nejvyšší úspěšnosti při kultivaci kmenů kvasinek na bramborovém agaru. Naproti tomu metoda č. 2 (EtOH-SAFA) jasně dominuje na YPD médiu. Metoda č. 1 (EtOH-CHCA) vykazovala procentuálně nejvyšší úspěšnost při kultivaci kmenů kvasinek na YPD médiu.

**Tab. 5** Počet získaných vhodných spekter pro vyhodnocení v závislosti na kultivačním médiu a metodě úpravy a aplikace vzorku v procentech (100% odpovídá 22 kmenům).

| Médium | Metoda přípravy a aplikace vzorku |               |              |
|--------|-----------------------------------|---------------|--------------|
|        | H <sub>2</sub> O-SAFA             | EtOH-SAFA     | EtOH-CHCA    |
| YPD    | 86,4 (19/22)                      | 100,0 (22/22) | 86,4 (19/22) |
| SA     | 45,5 (10/22)                      | 36,4 (8/22)   | 27,3 (6/22)  |
| ZA     | 90,9 (20/22)                      | 50,0 (11/22)  | 31,8 (7/22)  |

V klinických laboratořích, které vycházejí z postupů daných firmou Bruker Daltonik, se daří identifikovat neznámé izoláty na úrovni rodu a druhu a pouze v několika málo případech, zejména u druhu *Cr. neoformans*, došlo k zaměně za jiný druh nebo nebyl vůbec identifikován.

V našem případě nebyla metoda firmy Bruker Daltonik úspěšná na 100 %, a proto byla provedena kombinace metod a vybráno nejvhodnější kultivační médium, čímž bylo dosaženo té nejvyšší procentuální úspěšnosti. Nevhodnost metody firmy Bruker Daltonik již byla popsána v práci, ve které analyzovali stejnými postupy, jaké byly použity v rámci této bakalářské práce, fylogenetickou skupinu *Cryptococcus laurentii* I a II. Veškeré analyzované kmeny však byly kultivovány na sladidlovém agaru a některé vybrané kmeny také v laktózovém médiu [42]. I v tomto případě nedosáhla metoda firmy Bruker Daltonik prvenství. Jako neoptimálnější metoda však byla stanovena metoda č. 3, kdy byl vzorek celkem sedmkrát promýván destilovanou vodou, extrahován směsí kyseliny sinapové a ferulové a po centrifugaci nanesen na MALDI-TOF desku.

V celkovém shrnutí je tedy nejvýhodnějším médiem pro kultivaci kmenů kvasinek rodu *Cryptococcus* YPD médium a nejlepší metodou úpravy a aplikace vzorku metoda č. 2 (EtOH-SAFA). Z tohoto důvodu byla právě spektra získaná kultivací mikroorganismů a zpracováním vzorku za těchto podmínek použita pro sestrojení dendrogramu.

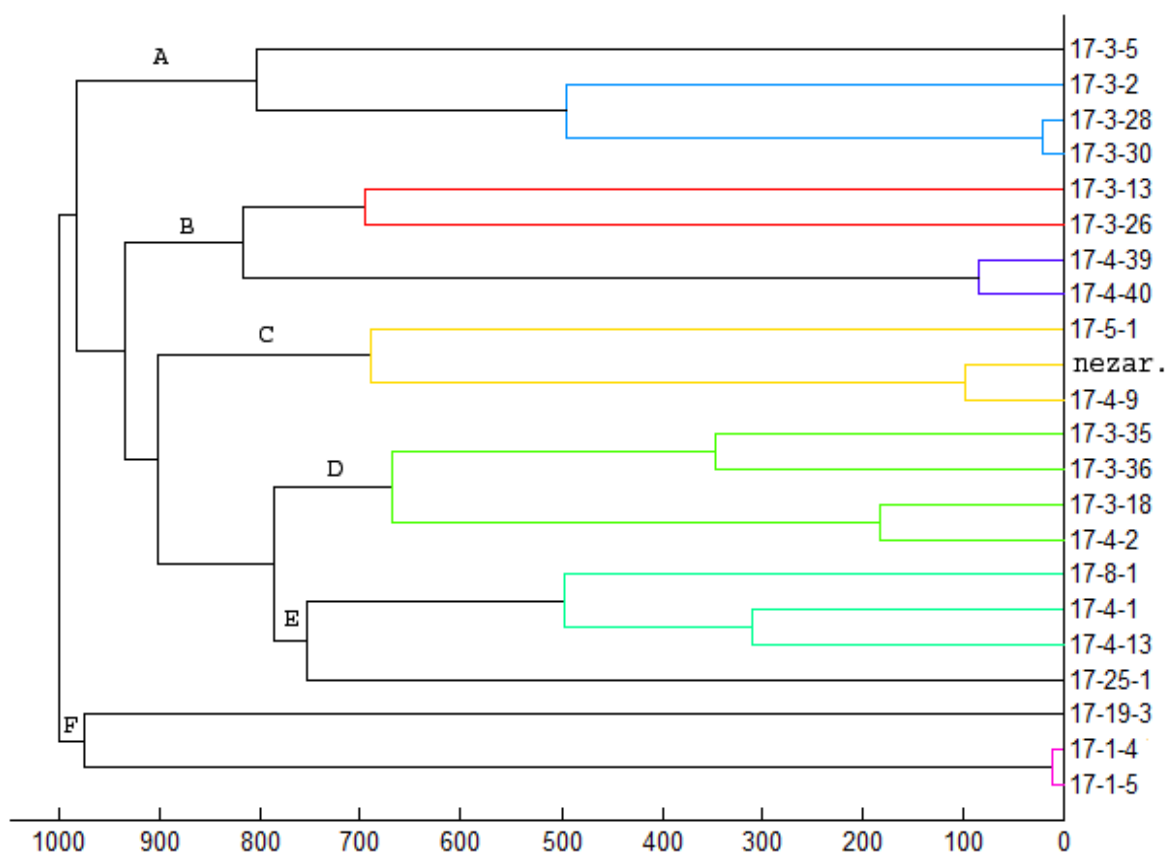
### 5.3 Vyhodnocení podobnosti kvasinek na základě hmotnostních spekter

V programu Maldi Biotyper 3.0 byl vytvořen dendrogram pro veškeré analyzované kmeny kultivované na YPD médiu a upravené pomocí metody č. 2, neboť toto médium a metoda byly vyhodnoceny jako nejvýhodnější pro biotypizaci kmenů kvasinek rodu *Cryptococcus*. Níže uvedený **Obr. 15** znázorňuje výsledný dendrogram pro 22 analyzovaných kmenů.

Písmena A, B, C, D, E, F označují jednotlivé větve dendrogramu. Zařazení kmene do určité skupiny pak vyjadřují horizontální čáry vedoucí k danému písmenu skupiny. Barevné označení větví každé skupiny vyjadřuje kmeny řadící se do dané fylogenetické skupiny případně ke druhu (podle délky čáry). Naproti tomu větve znázorněné černou barvou označují kmeny, které se do fylogenetické skupiny neřadí, ale vykazují vysokou podobnost s jedním nebo více kmeny dané skupiny na základě hodnoty skóre při vzájemném porovnání spekter.

Kvasinky I. fylogenetické skupiny *Cr. laurentii* jsou označeny písmenem A a světle modrou barvou. Do této skupiny se řadí kmeny *Cr. flavescens* CCY 17-3-28 a CCY 17-3-30, které vykazují vyšší podobnost se skóre 2,293, než *Cr. flavescens* CCY 17-3-30 s typovým *Cr. laurentii* CCY 17-3-2 (skóre 1,316). Samostatnou větev označenou černou barvou znázorňuje *Cr. flavus* CCY 17-3-5. Tento kmen nepatří do skupiny *Cr. laurentii*, vykazuje však podobnost s kmenem CCY 17-3-30 (skóre 1,248).

Červeně zbarvená větev skupiny B reprezentuje kvasinky II. fylogenetické skupiny *Cr. laurentii*. Do této skupiny spadají kmeny *Cr. carnescens* CCY 17-3-13 a *Cr. victoriae* CCY 17-3-26. Tmavě modrá větev skupiny B náleží kmenům *Cr. magnus* CCY 17-4-39 a CCY 17-4-40.



**Obr. 15** Dendrogram kvasinek rodu *Cryptococcus* pro YPD médium a metodu č. 2 (EtOH-SAFA).

První žlutě zbarvená větev skupiny C představuje kmen *Cr. gastricus* CCY 17-5-1. Níže umístěná žlutá větev reprezentuje *Cr. diffluens*, který je označen jako nezařazený, neboť není součástí Sbírkky kultur kvasinek a tudíž nenese sbírkové číslo. Součástí druhé větve spolu s nezařazeným kmenem je nesekvenovaný *Cr. aerius* CCY 17-4-9 se skóre 1,841. Poslední dva kmeny se vyznačovaly velmi uspokojivými spektry v případě všech kultivačních médií i použitých metod úpravy a aplikace vzorku a ve vytvořených dendrogramech se vyskytly s vysokou hodnotou skóre vedle sebe. Z tohoto důvodu bylo předpokládáno, že kmen CCY 17-4-9 je ve skutečnosti také kmenem *Cr. diffluens*. Tento předpoklad však může být potvrzen nebo vyvrácen na základě sekvenční analýzy.

Skupina s označením D a znázorněná zelenou barvou představuje kmeny *Bulleromyces albus* CCY 17-3-35 a CCY 17-3-36 a *Cr. saitoi* CCY 17-3-18 a CCY 17-4-2.

Označení E nesou tyrkysově zbarvené větve znázorňující kmeny CCY 17-4-1 (sekvenovaný *Cr. albidus*) a CCY 17-4-13 (nesekvenovaný *Cr. diffluens*). I když jsou tyto dva kmeny umístěny vůči sobě blíže než je sekvenovaný kmen CCY 17-8-1 (*Cr. terreus*), jejich skóre je překvapivě pouze 0,091, zatímco skóre mezi CCY 17-4-1 a CCY 17-8-1 je 1,660. Vzhledem k tomu, že sekvenovaný kmen *Cr. diffluens* se vyskytl už ve skupině C, byl kmen CCY 17-4-13 navržen na sekvenční analýzu. Zvláštní větev v rámci skupiny E označená černou barvou je vyhrazena pro kmen CCY 17-25-1 (sekvenovaný *Cr. aerius*). Tento fakt naznačuje, že CCY 17-4-9 ze skupiny C nebude patřit k tomuto druhu kvasinek.

Poslední skupina nese označení F a kromě samostatného kmene CCY 17-19-3 (*Cr. macerans*) obsahovala tato skupina též kontrolní kmeny *Cr. neoformans* var. *neoformans* CCY 17-1-4 a CCY 17-1-5, které měli skóre 2,576.

## 6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo posoudit vliv kultivačního média – YPD, bramborového a Sabouraudova agaru na identifikaci kvasinek rodu *Cryptococcus* hmotnostní spektrometrií a rozšířit databázi referenčních spekter pro potenciální identifikaci nově získaných izolátů Sbírkou kultur kvasinek.

Pomocí optimalizovaných metod úpravy a aplikace vzorku pro analýzu hmotnostní spektrometrií byla všechna naměřená spektra manuálně posouzena. Několik spekter nebylo možné k dalšímu vyhodnocení použít, neboť by mohlo dojít ke zkreslení výsledku po jejich normalizaci programem Maldi Biotyper 3.0. Za hlavní důvod potíží považují tvorbu extracelulárních polysacharidů a polysacharidové kapsule, které jsou typické pro celý rod *Cryptococcus*. Vliv polysacharidů se dal částečně eliminovat úpravou rozsahu m/z měření spekter a nahrazením CHCA jako matrice, která vizualizuje primárně menší m/z, směsí kyseliny sinapové a ferulové, které jsou doporučeny pro intaktní proteiny. Jako modelový druh byl vybrán nejznámější zástupce rodu *Cr. neoformans* var. *neoformans* (CCY 17-1-5), na kterém byly experimenty, celkově provedené s 22 kmeny, demonstrovány.

Ze tří kultivačních médií bylo nejméně extracelulárního kontaminantu produkováno na YPD médiu, které se tak stalo nejvhodnějším médiem pro kultivaci těchto kvasinek pro účely biotypizace. Jako metoda se nejlépe osvědčila metoda kombinovaná, založená na promývání buněk ethanolem dle doporučení firmy Bruker, ale s matricí složenou z roztoků kyseliny sinapové a ferulové v poměru 1:1. Kombinace YPD média a této metody poskytla až 100% úspěšnost v získání kvalitních hmotnostních spekter pro biotypizaci tohoto obtížného rodu kvasinek.

Program Biotyper umožnil také sestavit ze získaných spekter dendrogram, který vcelku správně zhodnotil podobnosti kmenu, t.j. zařadil spolu do skupiny kmeny s identickým druhem jako i fylogenetické skupiny. Výjimku tvořili dva nesekvenované kmeny, který byly reprodukovatelně zařazeny do skupiny s „nesprávnými“ sekvenovanými druhy, a proto jsme jejich zařazení navrhli prověřit Sbírkou kultur kvasinek CHÚ SAV sekvenací.

Z uvedených závěrů vyplývá, že biotypizace hmotnostní spektrometrií je rychlá a spolehlivá metoda, kterou lze využít i pro obtížné případy eukaryontu jako jsou kvasinky rodu *Cryptococcus*. Vzhledem k tvorbě extracelulárních látek, které mohou zkreslovat molekulový „fingerprint“ druhu, je nutné použít vhodné kultivační médium a metodu přípravy vzorku pro měření pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GOLDMAN, Emanuel a Lorrence H. GREEN. *Practical handbook of microbiology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. 853 s. ISBN 08-493-9365-5.
- [2] WALKER, Graeme M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 1998. 350 s. ISBN 04-719-6446-8.
- [3] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [4] ENGELKIRK, Paul G. a Janet L. DUBEN-ENGELKIRK. *Laboratory diagnosis of infectious diseases: essentials of diagnostic microbiology*. Baltimore: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams, 2008. 754 s. ISBN 07-817-9701-2.
- [5] BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. 190 s. ISBN 978-80-7318-516-9.
- [6] KURTZMAN, Cletus P. a Jack W. FELL. *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. New York: Elsevier, 2000, xxii, 1082 p. ISBN 978-012-3848-680.
- [7] KAVANAGH, Kevin. *Fungi: biology and applications*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2011, 366 s. ISBN 978-047-0977-095.
- [8] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Yeasts and yeast-like organisms*. Weinheim: VCH, 1990, 18, 528 s. ISBN 35-272-6162-1.
- [9] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002, 508 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [10] SIBIRNY, Andrei A. Mechanisms of autophagy and pexophagy in yeasts. *Biochemistry*. 2011, vol. 76, issue 12, s. 1279-1290. DOI: 10.1134/S0006297911120017. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S0006297911120017>
- [11] BARNA, Maria. Ribosomes take control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, vol. 110, issue 1, s. 9-10. DOI: 10.1073/pnas.1218764110. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1218764110>
- [12] ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, 2008, 1601 s. ISBN 978-081-5341-062.
- [13] ANAISSIE, Elias J., Michael R. MCGINNIS, Michael A. PFALLER. *Clinical mycology*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2009, 688 s. ISBN 978-141-6056-805.
- [14] ENE, Iuliana V. a Richard J. BENNETT. The cryptic sexual strategies of human fungal pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. [online]. 2014, vol. 12, issue 4, s. 239-251 [cit. 2015-02-11]. DOI: 10.1038/nrmicro3236. Dostupné z: [http://www.nature.com/nrmicro/journal/v12/n4/fig\\_tab/nrmicro3236\\_F2.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v12/n4/fig_tab/nrmicro3236_F2.html)

- [15] HOANG, Linda M.N., Peter PHILIPS a Eleni GALANIS. *Cryptococcus gattii*: a Review of the Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Management of This Endemic Yeast in the Pacific Northwest. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2011, roč. 33, č. 24, s. 187-195. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2011.11.003.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196439911000523>
- [16] FRASES, Susana, Bruno PONTES, Leonardo NIMRICHTER, Marcio L. RODRIGUES, Nathan B. VIANA a Arturo CASADEVALL. The Elastic Properties of the *Cryptococcus neoformans* Capsule. *Biophysical Journal*. 2009, vol. 97, issue 4, s. 937-945. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.04.043.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349509009102>
- [17] LOFTUS, Brendan J. The Genome of the Basidiomycetous Yeast and Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*. 2005, vol. 307, issue 5713, s. 1321-1324. DOI: 10.1126/science.1103773.  
Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1103773>
- [18] TAKASHIMA, Masako, SUGITA, Takashi, SHINODA, Takako, NAKASE, Takashi. 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/ijs.0.02498-0.  
Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.02498-0>
- [19] PATNAIK, Pradyot. *Dean's analytical chemistry handbook*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 2004, 1280 p. ISBN 00-714-1060-0.
- [20] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. V Brně: Vutium, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [21] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [22] BARKER, James. *Mass spectrometry*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 1999, 509 s. ISBN 04-719-6762-9.
- [23] GROSS, Jürgen H. *Mass spectrometry: a textbook*. 2nd ed. Berlin: Springer, 2011, 753 s. ISBN 978-364-2107-092.
- [24] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Hmotnostní spektrometrie*. [přednáška]. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 21. dubna 2014.
- [25] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří G. K. ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" modul K02-2014*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014, 430 s. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [26] LI, Liang. *MALDI mass spectrometry for synthetic polymer analysis*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2010, 299 s. ISBN 04-717-7579-7.

- [27] WYSOCKI, Vicki H., Kathryn A. RESING, Qingfen ZHANG a Guilong CHENG. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods*. 2005, vol. 35, issue 3. s. 211-222. DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.08.013.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202304002038>
- [28] PETER-KATALINIĆ, Jasna. Ed. by Franz Hillenkamp and Jasna Peter-Katalinić. *MALDI MS a practical to instrumentation, methods and applications*. 1. ed., 1. repr. Weinheim: Wiley-VCH, 2007, 430 s. ISBN 978-352-7314-409.
- [29] ČÍŽEK, Alois, Ivan MANGA a Martina MASAŘÍKOVÁ. *Využití hmotnostní spektrometrie MALDI TOF a polymerázové řetězové reakce ke confirmaci suspektních kultur Aeromonas salmonicida, Flavobacterium psychrophilum a Yersinia ruckeri: certifikovaná metodika*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014, 30 s. ISBN 978-80-7375-954-4.
- [30] DOWNARD, Kevin. *Mass spectrometry: a foundation course*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2004, 210 s. ISBN 08-540-4609-7.
- [31] WATSON, Throck J. a O. David SPARKMAN. *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2007, 818 s. ISBN 04-705-1634-8.
- [32] STEVENSON, Lindsay G., Steven K. DRAKE, Yvonne R. SHEA, Adrian M. ZELAZNY a Patrick R. MURRAY. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Clinically Important Yeast Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010, vol. 48, issue 10, s. 3482-3486. DOI: 10.1128/JCM.00687-09.  
Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/48/10/3482>
- [33] VAN VEEN, Suzanne Q., Eric C. J. CLAAS a Ed J. KUIJPER. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010, vol. 48, issue 3, s. 900-907. DOI: 10.1128/JCM.02071-09.  
Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/48/3/900>
- [34] DEKKER, John P. a John A. BRANDA. MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2011, vol. 33, issue 12, s. 87-93. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2011.05.003.  
Dostupné z: <http://www.cmnewsletter.com/article/S0196-4399%2811%2900023-7/abstract>
- [35] MCTAGGART, Lisa R., Eric LEI, Susan E. RICHARDSON, Linda HOANG, Annette FOTHERGILL a Sean 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, vol. 49, issue 8, s. 3050-3053. DOI: 10.1128/JCM.00651-11.  
Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00651-11>

- [36] DHIMAN, Neelam, Leslie HALL, Sherri L. WOHLFIEL, Seanne P. BUCKWALTER a Nancy L. WENGENACK. 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, vol. 49, issue 4, s. 1614-1616. DOI: 10.1128/JCM.02381-10.  
Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/49/4/1614>
- [37] YAN, Yingjun, Ying HE, Thomas MAIER, Criziel QUINN, Gongyi SHI, Haijing LI, Charles W. STRATTON, Markus KOSTRZEWA a Yi-Wei TANG. 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, vol. 49, issue 7, s. 2528-2532 DOI: 10.1128/JCM.00339-11.  
Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00339-11>
- [38] BRUKER DALTONIK GMBH. MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2. February 2011.
- [39] Literature room: Brochure: MALDI Biotyper Pharmaceutical Microbiology. *Bruker* [online]. 2014 [cit. 2015-04-10].  
Dostupné z: [https://www.bruker.com/fileadmin/user\\_upload/8-PDF-Docs/Separations\\_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1830970\\_MBT-Pharma-Brochure\\_11-2014\\_ebook.pdf](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1830970_MBT-Pharma-Brochure_11-2014_ebook.pdf)
- [40] Bruker Ultraflex MALDI-TOF/TOF. Chemistry & Biochemistry: Mass Spectrometer Center [online]. 2014 [cit. 2015-04-20].  
Dostupné z: <http://www.chem.sc.edu/mslab/Ultraflex.html>
- [41] KURTZMAN, Cletus P. a Christie 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.
- [42] JÄGER, Jakub. 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.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

|                   |                                                           |
|-------------------|-----------------------------------------------------------|
| ADP               | Adenosindifosfát                                          |
| AIDS              | Syndrom získaného selhání imunity                         |
| APCI              | Chemická ionizace za atmosférického tlaku                 |
| APPI              | Fotoionizace za atmosférického tlaku                      |
| ATG               | Autofagický gen                                           |
| ATP               | Adenosintrifosfát                                         |
| ATPáza            | Adenosintrifosfatáza                                      |
| CCY               | Sbírka kultur kvasinek                                    |
| CI                | Chemická ionizace                                         |
| CO <sub>2</sub>   | Oxid uhličitý                                             |
| DNA               | Deoxyribonukleová kyselina                                |
| DHB               | 2,5-dihydroxybenzoová kyselina                            |
| EI                | Elektronová ionizace                                      |
| ESI               | Elektrosprejová ionizace                                  |
| ER                | Endoplazmatické retikulum                                 |
| FADH <sub>2</sub> | Flavinadenindinukleotid                                   |
| FD                | Ionizace elektrickým polem                                |
| FI                | Ionizace elektrickým polem                                |
| FT-ICR            | Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací |
| GC-MS             | Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií |
| GTP               | Guanosintrifosfát                                         |
| GXMan             | Glukuronoxylomanan                                        |
| HIV               | Virus lidské imunitní nedostatečnosti                     |
| HRMS              | Sektorový analyzátor s dvojitou fokusací                  |
| CHCA              | $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina               |

|                 |                                                                         |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|
| ICP             | Indukčně vázané plazma                                                  |
| IT              | Iontová past                                                            |
| ITS             | Vnitřní přepisovaný mezerník (spacer)                                   |
| LC-MS           | Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie            |
| LDI             | Desorpce a ionizace laserem                                             |
| LP-MID          | Lineárně pozitivní mód                                                  |
| LSU rRNA        | Velká podjednotka ribozomální ribonukleové kyseliny                     |
| MALDI MS        | Desorpce a ionizace laserem za účasti matrice                           |
| MALDI-TOF/TOF   | Desorpce a ionizace laserem za účasti matrice s průletovým analyzátozem |
| MAT lokus       | Lokus párovacího typu                                                   |
| MCP             | Mikrokanálový destičkový detektor                                       |
| mRNA            | Mediátorová ribozomální kyselina                                        |
| MS-MS           | Spojení dvou hmotnostních spektrometrů                                  |
| MXGal           | Galaktoxylomanan                                                        |
| NADH            | Nikotinamidadenindinukleotid                                            |
| NALDI           | Desorpce a ionizace za účasti nanočástic                                |
| PCR             | Polymerázová řetězová reakce                                            |
| RNA             | Ribonukleová kyselina                                                   |
| rRNA            | Ribozomální ribonukleová kyselina                                       |
| RP <sub>s</sub> | Ribozomální proteiny                                                    |
| SAFA            | Směs kyseliny sinapové a ferulové                                       |
| SA              | Sabouraudův agar                                                        |
| SELDI           | Desorpce a ionizace s vylepšeným povrchem                               |
| TOF             | Průletový analyzátor                                                    |
| YPD             | Kultivační médium pro kvasinky s obsahem peptonu a dextrózy             |
| ZA              | Bramborový agar                                                         |