

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-  
TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Gabriela Vovková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Detekce a identifikace rodu *Candida*  
pomocí sekvenování nové generace

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Gabriela Vovková**  
Osobní číslo: **C18300**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Detekce a identifikace rodu *Candida* pomocí sekvenování nové generace**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši o detekci a identifikaci rodu *Candida* pomocí sekvenování nové generace.
2. V práci se zaměřte na definici rodu *Candida*, uveďte obecný princip metody sekvenování nové generace a na závěr popište detekci a identifikaci rodu *Candida* pomocí sekvenování nové generace.
3. Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Lucie Michalcová**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

LS.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Detekce a identifikace rodu *Candida* pomocí sekvenování nové generace jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019. Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne: 21.07.2021

Gabriela Vovková

## PODĚKOVÁNÍ:

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Barboře Jankovičové, Ph.D. za zadání zajímavého tématu. Dále bych na tomto místě ráda poděkovala své konzultantce bakalářské práce Ing. Lucii Michalcové za odborné vedení, za pomoc, za trpělivost, vstřícný přístup a rady při zpracování této práce.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se věnuje identifikaci a detekci rodu *Candida* pomocí sekvenování nové generace. Obsah práce se zabývá obecným popisem vlastností rodu *Candida* jejich virulencí, výskytem a vlastnostmi, dále tato práce popisuje základní detekční a identifikační metody. Závěrečná kapitola popisuje konkrétní metody detekce *Candida* spp. za pomoci sekvenování nové generace.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Candida* spp., detekce, identifikace, sekvenování, DNA, RNA, sekvenování nové generace

## **TITLE**

Detection and identification of the genus *Candida* by next generation sequencing

## **ANNOTATION**

The aim of this bachelor's thesis is the identification and detection of the *Candida* genus using the new generation's sequencing. The content of the research paper is focused on the general characterization of attributes of the *Candida* genus and its virulence, occurrence, and characteristics. In addition, it executes a description of basic detection and identification methods. The final chapter deals with a concrete analysis of the detection of *Candida* spp. using the new generation's sequencing.

## **KEYWORDS**

*Candida* spp., detection, identification, sequencing, DNA, RNA, next generation sequencing

## Obsah

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK .....	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	10
ÚVOD .....	12
1. KVASINKY – OBECNÁ CHARAKTERISTIKA .....	13
1.1 Taxonomie kvasinek.....	14
1.2 Rozmnožování kvasinek.....	14
1.3 Genetická výbava kvasinek.....	15
1.3.1 Genetická informace <i>Candida albicans</i> .....	17
2. DRUHY <i>CANDIDA</i> A JEJICH VLASTNOSTI .....	19
2.1 <i>Candida albicans</i> .....	19
2.2 <i>Candida tropicalis</i> .....	20
2.3 <i>Candida glabrata</i> .....	20
2.4 <i>Candida parapsilosis</i> .....	21
2.5 <i>Candida auris</i> .....	21
3. DETEKCE A IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ .....	22
3.1 Historie .....	22
3.2 Identifikační metody <i>Candida spp.</i> .....	23
3.2.1 Fenotypové metody.....	23
3.2.1.1 Rychlé komerční systémy .....	24
3.2.1.2 Chromogenní komerční systémy .....	24
3.2.2 Metody molekulární identifikace a detekce .....	25
3.2.2.1 Polymerázová řetězcová metoda (PCR) .....	25
3.2.2.2 Metody založené na PCR.....	29
3.3 Detekční metody <i>Candida spp.</i> .....	33
4. DETEKCE A IDENTIFIKACE POMOCÍ SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE .....	35
4.1 Sangerova metoda .....	36
4.2 Sekvenování nové generace.....	37
4.2.1 Technologie sekvenování 454.....	38
4.2.2 Sekvenování Illumina.....	38
5. DETEKCE RODU <i>CANDIDA</i> POMOCÍ SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE.....	39
ZÁVĚR.....	41
SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ .....	42



## **Seznam ilustrací a tabulek**

### **Seznam tabulek**

<b>Tabulka 1.</b> Taxonomie <i>Candida</i> species .....	14
<b>Tabulka 2</b> Primery použité při multiplexní vnořené PCR.....	31

### **Seznam ilustrací**

<b>Obrázek 1</b> DNA dvoušroubovice.....	16
<b>Obrázek 2</b> Translace a transkripce.....	17
<b>Obrázek 3</b> Schéma kmenových linií <i>Candida albicans</i> .....	18
<b>Obrázek 4</b> Schéma jednoho cyklu PCR.....	27
<b>Obrázek 5</b> Schéma amplifikace molekuly DNA metodou PCR.....	28
<b>Obrázek 6</b> Struktura dideoxynukleotidu a deoxynukleotidu.....	36

## Seznam zkratk a značek

AIDS – syndrom získaného imunodeficitu (z angl. acquired immune deficiency syndrome)

ALS – aglutininové sekvence (z angl. agglutinin like sequence)

API – analytický profilový index (z angl. analytical profile index)

BIGGY – bismut, sulfid, glukóza, glycin kvasinkový agar

C. – *Candida*

CDR1 – *Candida* rezistentní gen na léky 1 (z angl. *Candida* Drug Resistance)

CDR2 – *Candida* rezistentní gen na léky 2 (z angl. *Candida* Drug Resistance)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ddATP – dideoxyadenosin 5'-trifosfát

ddCTP – dideoxycytidin-5'-trifosfát

ddGTP – dideoxyguanosin 5'-trifosfát

ddTTP – dideoxythymidin 5'-trifosfát

ddNTP – dideoxynukleotid

dsDNA – dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina

ERG11 – označení genu kódující enzym 14- $\alpha$ -demetyláza

FKS – označení genu kódující enzym glykosyltransferázu 1,3- $\beta$ -D-glukan syntázu

ITS – interní transkribovaná spacerová oblast

ITS1 – interní transkribovaná spacerová oblast jedna

ITS2 – interní transkribovaná spacerová oblast dva

JIP – jednotka intenzivní péče

kb – kilobáze

LNA – uzamčené nukleové báze (z angl. locked nucleic acids)

Mb – megabáze

MDR1 – zkratka genu kódující multi-rezistenci na léky (z angl. multi drug resistance)

MLST – multilokusové typizační sekvenování

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NCAC – non-*Candida albicans Candida*

NGS – sekvenování nové generace (z angl. Next Generation Sequencing)

ORF – otevřené čtecí rámce (z angl. open reading frame)

RNA – ribonukleová kyselina

RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů

PCR – polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

pPNA – pseudopeptidová nukleová kyselina (z angl. pseudopeptide nucleic acids)

rDNA – ribozomální deoxyribonukleová kyselina

ssDNA – jednovláknová DNA

spp. – poddruh

## Úvod

Kvasinky jsou eukaryotické mikroorganismy, které jsou významné pro lidstvo. Některé kvasinky jsou lidstvu prospěšné, jako je například kvasinka *Sacharomyces cerevisiae*, ale jiné druhy kvasinek mohou způsobit onemocnění, která jsou závažná pro člověka. Mezi takové kvasinky se řadí nejčastěji detekovaný zástupce z rodu *Candida*, a to konkrétně *Candida albicans*. Tato kvasinka je jednou z nejčastějších příčin vzniku onemocnění zvané kandidóza.

Význam správné detekce a identifikace kvasinkových infekcí v posledních letech roste, v důsledku častého vzniku rezistence a většího výskytu kvasinek v nemocnici. Mezi detekční a identifikační metody patří jak klasické kultivační techniky, tak i metody založené na molekulární detekci a identifikaci. Kultivační metody jsou stále prováděny, ale mají velké nedostatky. Molekulární metody jsou novodobé přístupy detekce a identifikace mikroorganismů. Do molekulárních metod patří i sekvenování nové generace. Sekvenování je genetický proces, při kterém se určí primární struktura DNA. Výsledkem je lineární kód neboli sekvence.

Cílem této práce je vytvořit ucelený přehled diagnostických metod využívaných pro detekci a identifikaci rodu *Candida* pomocí sekvenování nové generace. V této práci se zaměřuji na přímé detekční metody využívané v současné době. Také se zaměřuji na identifikaci a rozklíčování genomu kvasinek pomocí sekvenování.

## 1. Kvasinky – obecná charakteristika

Kvasinky jsou jedny z nejvyužívanějších modelových organismů. S využíváním kvasinek a jejich vlastností se začalo již v Egyptě a v Řecku, a to k výrobě chleba a alkoholických nápojů. První, kdo je zpozoroval, jako malé kuličky, byl zřejmě Anton von Leewenhoek v 17. století. Úloha kvasinek při kvašení, výrobě chleba a nápojů se dlouho zpochybňovala, až Cagniard de Latour, Schwann a Kützing ukázali, že kvašení je výsledek vegetativního růstu kvasinek. Nakonec to byl Luis Pasteur, který v roce 1857–1863 jednoznačně ukázal úlohu kvasinek a jiných mikroorganismů v procesu kvašení. Od těchto začátků uběhlo již několik let a kvasinky se mezitím staly ekonomicky a kvantitativně nejpoužívanějšími mikroorganismy v průmyslu. Vzhledem ke svým vlastnostem představují nepostradatelný model experimentálních výzkumů eukaryotické buňky. Jedno z největších využití je v potravinářském průmyslu k výrobě piva (1).

Kvasinky jsou eukaryotické mikroorganismy, které přes svoji velikost mají komplexní organizaci cytoplazmy, a tím jsou podobné buňkám vyšších eukaryot.

Kvasinky jsou vhodné pro studium jistých aspektů molekulární a buněčné biologie, které odlišují eukaryotické buňky od prokaryotických. Výhody kvasinkových buněk spočívají v lehké manipulaci a rychlému růstu homogenních kolonií za různých podmínek (1).

*Candida* spp. patří mezi nejčastější původce oportunních mykóz. Je běžnou součástí lidské mikroflóry kůže, ústní dutiny, a střev. V klinických laboratořích dochází k časté izolaci kvasinek z těchto míst. Pokud dojde k porušení rovnováhy mezi naší přirozenou mikroflórou a prostředím, může dojít k pomnožení kvasinek a jejich invazi do jiných tkání. V důsledku této skutečnosti je možnost vyvolání život ohrožujících infekcí. Příčinou vzniku nerovnováhy bývá imunodeficitní stav pacienta v důsledku přítomnosti jiného onemocnění, případně dlouhodobé užívání širokospektrých antibiotik (2, 3).

*Candida* spp. je součástí jak lidské mikroflóry, tak je i běžnou obyvatelkou životního prostředí. Především ji můžeme najít na listech, květech, ve vodě a půdě (3).

Z rodu *Candida* známe přibližně 200 druhů, které byly doposud popsány, ale jenom některé jsou považovány za skutečné patogeny pro lidský organismus. Mezi tyto patogenní mikroorganismy rodu *Candida* patří nejhojnější zástupce, a to *Candida albicans*, která patří

mezi nejčastější původce kandidóz. Dalšími původci kandidových infekcí jsou zejména *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* a *C. lusitaniae* (2, 3).

Kvasinky jsou eukaryotní organismy. Patří mezi tzv. mikromycety jinak také houby mikroskopických rozměrů. Jejich velikost obvykle dosahuje 3-15  $\mu\text{m}$ . Jsou tedy větší než bakteriální buňky. Morfologie kvasinek souvisí se způsobem jejich vegetativního rozmnožování. Buňky mají nejčastěji tvar elipsoidní, vejcovitý až kruhový. Mezi pravé kvasinky se řadí ty, které se rozmnožují pohlavní cestou. Mezi nepravé kvasinky pak ty, které se rozmnožují cestou asexuální. Později došlo u některých kvasinek řazených mezi nepravé k objevení pohlavních stádií tzv. teleomorf. Z pozdějších objevů pohlavního rozmnožování je patrné, že od tohoto dělení kvasinek se upouští (1, 2, 4).

### 1.1 Taxonomie kvasinek

Již v úvodu bylo popsáno dělení kvasinek na pravé a nepravé, ale z mnoha pozdějších objevů je patrné, že tohle dělení je nedostačující. Na taxonomickém začlenění kvasinek se podílela světoznámá odbornice v oblasti mykologie RNDr. Anna Kocková-Kratochvílová, DrSc., která vychází ze základního členění kvasinek do tří tříd podle způsobu rozmnožování na *Ascomycetes* (*Endomycetes*), *Basidiomycetes* a *Deuteromycetes* (2, 4).

Tabulka 1 ukazuje postavení *Candida* species v říši hub (6).

<b>ŘÍŠE</b>	<i>Fungi</i>
<b>KMEN</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>PODKMEN</b>	<i>Ascomicotina</i>
<b>TŘÍDA</b>	<i>Ascomycetes</i>
<b>ŘÁD</b>	<i>Saccharomyceteae</i>
<b>ČELEĎ</b>	<i>Saccharomycetaceae</i>
<b>ROD</b>	<i>Candida</i>

Tabulka 1. Taxonomie *Candida* species (6).

### 1.2 Rozmnožování kvasinek

Většina rodů kvasinek se rozmnožuje pučením. Na povrchu mateřské buňky se struktura jednoho bodu pozmění a na tomto místě se objeví pupen. Ten pak postupně roste, dokud

nedosáhne velikosti mateřské buňky. Mezitím se jádro mitózou rozdělí na dvě a jedno z nich přejde do dceřiné buňky. Uzavřením septa a dotvořením buněčné stěny se buňky od sebe oddělí. Po pupenu na mateřské buňce zůstává jizva. Podle počtu jizev lze určit věk buňky (1, 34).

Vzácnější formou vegetativního rozmnožování kvasinek je příhrádkové dělení. Buňky těchto kvasinek rostou ve směru své délky a při dosažení určité velikosti dochází k mitotickému dělení jádra. Mitózou vzniknou dvě jádra se shodnou genetickou informací, každé z nich putuje k jednomu pólu buňky a ve středu se vytvoří příhrádka tzv. septum. Tento způsob rozmnožování připomíná dělení bakterií a je charakteristické jen pro rod *Schizosaccharomyces*.

Vedle vegetativního rozmnožování je i známé pohlavní rozmnožování, které charakterizuje splynutí dvou haploidních buněk a jejich jader za vzniku diploidní buňky – zygoty. V životním cyklu kvasinek dochází ke střídání haploidní a diploidní fáze. Vzájemný poměr mezi fázemi je rozdílný pro každý rod.

Z hlediska dědičnosti má mimořádný význam střídání obou fází. V haploidní fázi je možné poměrně snadno zjistit mutace, které se projeví. V diploidní fázi lze studovat vzájemné vztahy alel a jejich dominanci (1, 34).

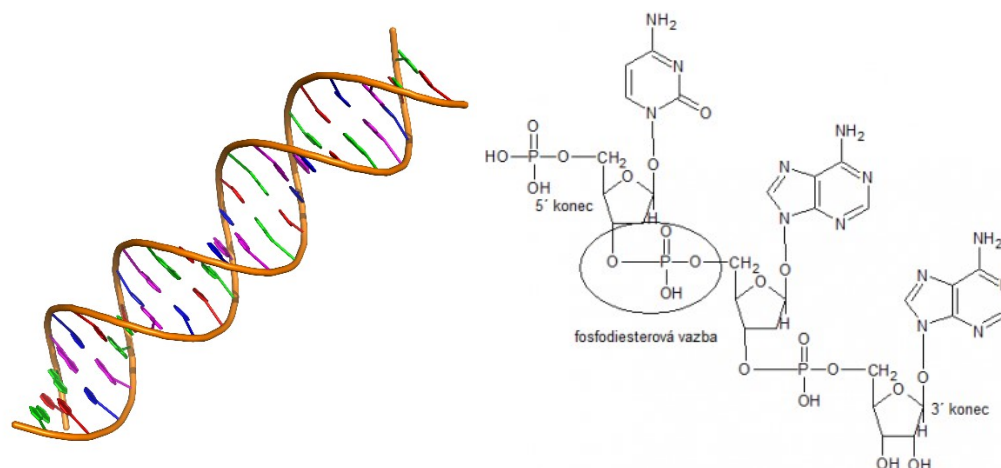
### 1.3 Genetická výbava kvasinek

Kvasinky jsou charakteristickou skupinou živých systémů, odlišující se velkým množstvím vlastností, nejen od jiných mikroorganismů, ale i od vyšších organismů (1).

Genetická informace kvasinek je vázána na molekuly DNA. DNA se nachází v podobě chromozomů v jádře buňky, ale může být i mimo jádro jako mimojaderná DNA. Ta se nachází v mitochondriích nebo plazmidech. Některé kvasinky obsahují i mimojaderné genetické determinanty dsRNA, které jsou zodpovědné za tvorbu toxinu usmrcujícího buňky (1).

Haploidní genom jádra kvasinek má velikost  $1.10^{10}$  daltonů, tvoří ho přibližně 14 500 kb a obsahuje 6 500 genů. V porovnání s ostatními mikroorganismy např. *E. coli* je genom kvasinek čtyřikrát větší a je přibližně velký jako genom nejkompexnějších prokaryotních organismů, kterými jsou streptomycey. Genom kvasinek je rozdělený do více chromozomů, jejichž počet a velikost jsou rozdílné pro každý rod (1).

Struktura DNA je složena ze tří částí (viz. obrázek 1). Skládá se z dusíkatých bází, fosfátových skupin a cukerných zbytků, konkrétně se jedná o  $\beta$ -D-deoxyribózu. V případě RNA je cukerný zbytek  $\beta$ -D-ribóza. Dusíkaté báze, které se nachází v DNA nebo RNA jsou heterocyklické molekuly odvozené od purinu nebo pyrimidinu. Ve dvou známých nukleových kyselinách se běžně vyskytuje pět bází. Ty, které jsou odvozené z purinu jsou adenin (A) a guanin (G), obecně se nazývají purinové báze. Ty, které jsou odvozené od pyrimidinu, se nazývají pyrimidinové a řadí se mezi ně thymin (T), cytozin (C), a v molekule RNA je thymin nahrazen uracilem (U). Dusíkaté báze jsou součástí podjednotek tvořících DNA, tzv. nukleotidů. Nukleotid obsahuje jednu z dusíkatých bází, cukernou složku a fosfátovou skupinu. Molekula DNA je tvořena dvěma polynukleotidovými vlákny, které mají opačnou orientaci. Jedno vlákno je orientováno ve směru 5 $\rightarrow$ 3 konci a druhé vlákno je orientováno od 3 $\rightarrow$ 5 konci (5).



**Obrázek 1** DNA dvoušroubovice (26, 27).

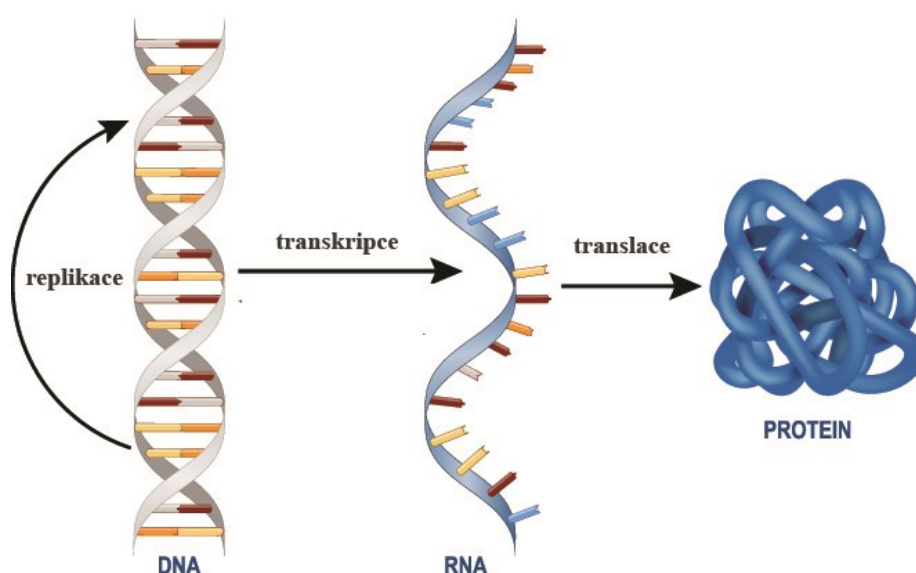
Na obrázku vlevo je struktura DNA. Obrázek vpravo popisuje vznik fosfodiesterové vazby. Fosfodiesterová vazba je kovalentní propojení dvou hydroxylových skupin s jednou fosfátovou skupinou. V DNA toto spojení vzniká propojením uhlíku číslo 5 na jednom cukerném zbytku s uhlíkem v poloze 3 u sousedního cukru.

DNA je lineární polymer deoxyribonukleových podjednotek. Řetězec nukleotidů je vytvořen spojením hydroxylové skupiny cukerného zbytku jednoho nukleotidu a fosfátové skupiny, která je současně připojena k cukernému zbytku sousedního nukleotidu. Cukry jsou vzájemně propojeny přes fosfátové skupiny. Fosfátová skupina připojená na uhlík číslo 5



v cukru je také připojena přes hydroxylovou skupinu na uhlíku číslo 3 u sousedního cukru. Takto je zapisováno pořadí dusíkatých bází od 5 konce ke 3 konci (5).

Genetická informace je uložena v pořadí dusíkatých bází v DNA, kde je pořadí čteno a dekódováno ve dvou fázích. Prvním krokem je transkripce (viz. obrázek 2). Kde dochází k přepisu z jednoho vlákna DNA do komplementární sekvence bází podobné molekuly, a to do mRNA (mediátorová RNA). Ve druhé fázi dochází k překlada ze sekvence bází do sekvence aminokyselin, tento krok se nazývá translace. Translace začíná na přesně definovaném místě sekvence mRNA. Produktem translace je určité pořadí aminokyselin, ze kterého vzniká protein (5).



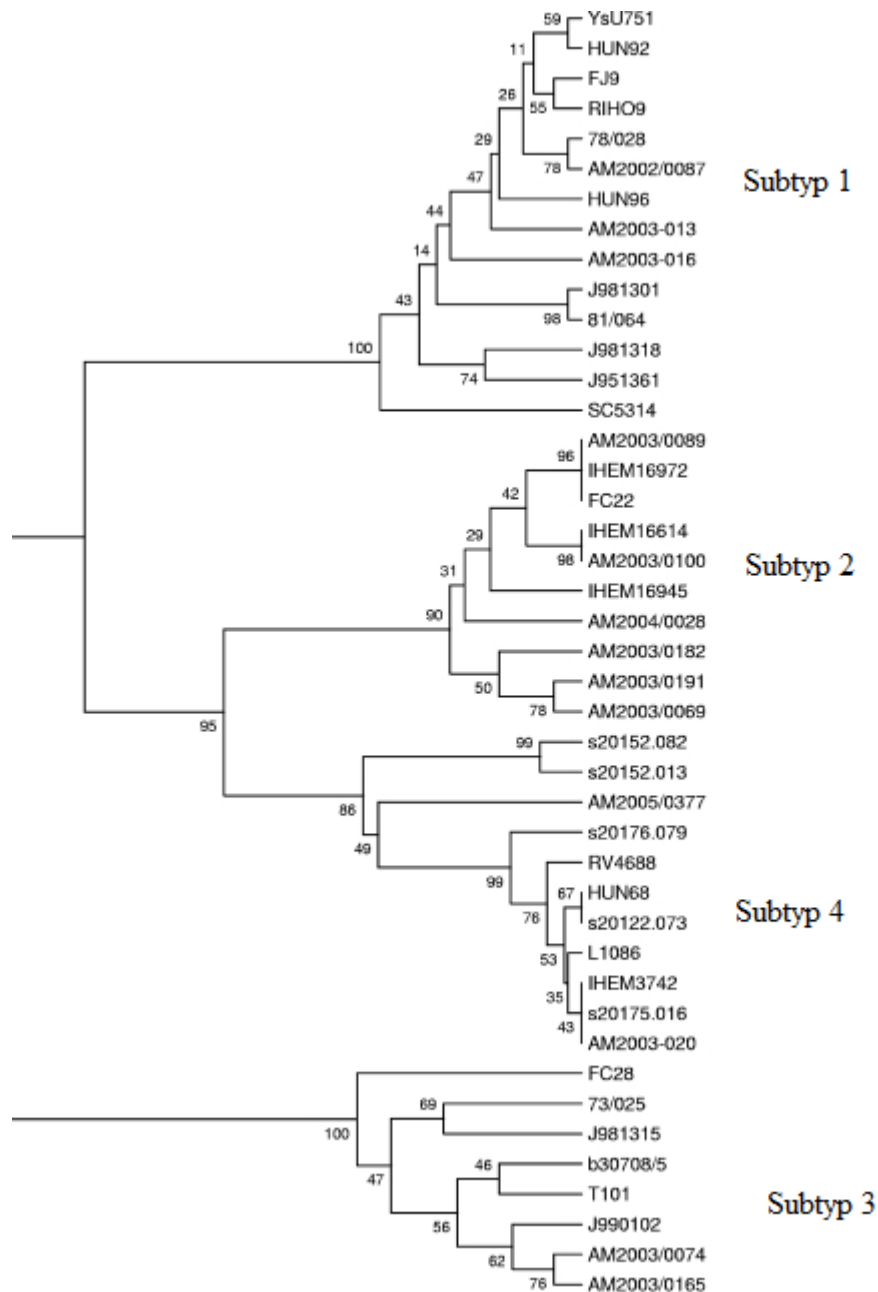
**Obrázek 2** Translace a transkripce (28).

Přepis genetické informace z DNA do komplementární sekvence mRNA procesem transkripce. Produkt z transkripce slouží jako templát pro proces translace, kdy se informace z mRNA přepisuje do pořadí aminokyselin, ze kterých poté vzniká protein (5).

### 1.3.1 Genetická informace *Candida albicans*

Genetická informace u kvasinky *Candida albicans* je uložena na osmi chromozomech. Tyto chromozomy jsou označeny 1–7 a R a tvoří haploidní genom o velikosti 14 851 kilobází, který obsahuje 6 419 otevřených čtecích rámců (OFR). Otevřeným čtecím rámcem se rozumí ta část mRNA nebo DNA, která je ohraničená iniciačním kodonem a stop kodonem (10).

Izoláty *C. albicans* analyzované multilokusovou sekvenční typizací (MLST) nebo DNA fingerprinting metodou se středně opakujícím se oligonukleotidem Ca3, lze pro usnadnění přiřadit k podskupinám blízce příbuzných typů kmenů, jako subtyp. Hlavní subtypy jsou značené 1–4 (viz obrázek 3) do nichž je zařazeno až 70 % izolátů *Candida albicans* podle shodných typizačních vlastností potvrzených MLST nebo DNA fingerprinting (11).



**Obrázek 3** Schéma kmenových linií *Candida albicans* (11).

U *Candida albicans* byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi subtypy v počtu tandemových opakujících sekvencí v alelách genů ALS3, ALS5 a ALS6, tyto alely spadají do

rodiny genů ALS. Rodina genů ALS (aglutinin like sequence) u *C. albicans* zahrnuje osm genů značených ALS1 až ALS7 a ALS9, některé z nich odpovídají za schopnost *C. albicans* adherovat k povrchu hostitele. Počet tandemově opakujících se kopií sekvencí se liší mezi kmeny *C. albicans* a často mezi alelami v rámci stejného kmene. Alely ALS mohou kódovat proteiny o různé velikosti, které mohou mít různé funkční charakteristiky, a proto je důležité definovat rozsah alelické variability (11).

## 2. Druhy *Candida* a jejich vlastnosti

Invazivní plísňové infekce, jako jsou kandidózy, představují závažný problém ve zdravotnictví. Schopnost být patogeny a komenzály byla vyvrácena u přibližně 65 % druhů *Candida* pozdějším výzkumem toho, že některé druhy nedokážou přežít teplotou 37 °C. Počet infekcí způsobených *Candida species* v posledních třech desetiletích vzrostl, a to z důvodu vzestupu epidemie AIDS, vyššího věku obyvatelstva a většího výskytu pacientů s oslabenou imunitou (7).

Nejčastějším a nejhojnějším zástupcem je *Candida albicans*. Většina případů kandidóz je připisována právě *C. albicans*, nicméně v poslední době byly identifikovány NCAC (non-*Candida albicans Candida*) druhy jako lidské patogeny. Vzrůst výskytu NCAC byl zaznamenán díky zlepšení diagnostických metod. Vysoká prevalence NCAC v posledních dvou desetiletích může být způsobena jejich vysokou odolností proti antifungálním lékům (7, 8).

Schopnost *Candida* tvořit biofilmy má důležité klinické opodstatnění kvůli jejich zvýšené odolnosti vůči léčbě a schopnosti kvasinek v biofilmu odolat imunitní obraně hostitele. Vzhledem k závažnosti tvorby biofilmu jsou podrobně zkoumány tři konkrétní druhy NCAC, a to *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* (7, 9).

### 2.1 *Candida albicans*

Tento druh je nejčastěji izolovanou kvasinkou u lidí. Je součástí povrchových i systémových infekcí. Mezi rizikové faktory vzniku infekce patří věk nad 65 let, imunosuprese při podání steroidů a pobyt na JIP (8).

*C. albicans* má schopnost měnit svoji morfologii, může se tak vyskytovat ve třech formách, a to v kvasinkové, pseudohyfální a hyfální v závislosti na prostředí. Faktory

virulence, jako je maskování se před imunitním systémem člověka, měnění morfologie a její častý výskyt v nemocničních zařízeních dělá z *C. albicans* nebezpečný druh pro pacienty s oslabenou imunitou (8).

Produkce biofilmu umožňuje buňkám lépe adherovat a množit se na lékařsky implantovaných zařízeních (např. katetr) i v hostitelských tkáních. Produkce biofilmu u *C. albicans* je důležitá pro rezistenci, některé studie uvádí až 1000krát větší rezistenci při produkci biofilmu. U *C. albicans* se může zvednout její rezistence na azoly se zvýšeným počtem efluxních pump. Tyto pumpy zabrání intracelulární akumulaci léčiva, čímž zabrání toxickým hladinám léčiva, které by mohlo vést k usmrcení (8).

## 2.2 *Candida tropicalis*

*Candida tropicalis* je nejčastěji pozorována u pacientů s neutropenií a malignitou. Mezi faktory virulence patří adheze k epiteliálním a endoteliálním buňkám, sekrece lytických enzymů (např. proteinázy, hemolyziny) a fenotypová změna (8).

*Candida tropicalis* patří mezi silné producenty biofilmu, to se ovšem odráží v její vysoké rezistenci k mnoha lékům. Vykazuje odolnost vůči azolům a zvláště vysokou odolnost vůči flukonazolu. Její mechanismus rezistence na azoly je podobný jako u jiných druhů *Candid*. Na rozdíl od ostatních *Candid* vykazuje *C. tropicalis* malou rezistenci vůči echinokandinům. V současnosti tyto léky vykazují dobrou aktivitu a jsou skvělou formou pro léčení infekcí způsobených kvasinkou *Candida tropicalis* (8, 7, 9).

## 2.3 *Candida glabrata*

*Candida glabrata* je druh, který je odpovědný za rezistenci v nemocnicích a je druhým nejčastěji izolovaným mikroorganismem z kandidových infekcí. Spolu s *Candida tropicalis* a *C. parapsilosis* jsou nejčastějšími příčinami orální kandidózy. Vyskytuje se více u dospělých jedinců než u dětí (8).

I přes svou neschopnost přecházet z kvasinky do hyfy jako *C. albicans* nebo přes neschopnost vylučovat proteázové enzymy, má *Candida glabrata* mnoho jiných faktorů virulence. Mezi nejdůležitější faktor patří produkce hustého biofilmu. Má také schopnost se vyhnout imunitnímu systému hostitele, aniž by došlo k závažnému poškození (8, 9).

Tato kvasinka má sníženou citlivost na azoly z nadměrné exprese efluxních pump a také zkříženou rezistenci na jiné azoly (8).

Jedná se o jedinečný druh kvasinky, která má schopnost získávat a poté exprimovat rezistenční mutace za přítomnosti selekčního tlaku vyvolaného zvýšeným používáním azolů a echinokandinů v klinickém prostředí (8).

## 2.4 *Candida parapsilosis*

Infekce vyvolané kvasinkou *Candida parapsilosis* se v poslední době zvýšily a staly se druhou nebo třetí příčinou kandiózy hned po *Candida albicans* v některých evropských, latinskoamerických a asijských lékařských centrech. Infekce vyvolané *C. parapsilosis* jsou závažný problém u novorozenců, pacientů po transplantaci a pro pacienty užívající parenterální výživu (8).

Má schopnost tvořit biofilm na zdravotnických prostředcích, kolonizovat intravaskulární zařízení a protetické materiály. Také má schopnost provést fenotypovou změnu a vylučovat hydrolytické enzymy. Tyto faktory vedly k výskytu nozokomiálních ohnisek a vysoké úmrtnosti. Ačkoliv úmrtnost je kolem 4 %, což je mnohem méně než u *Candida albicans*, tak *Candida parapsilosis* zaujímá druhé místo v produkci biofilmu mezi druhy *Candida* (7, 8, 9).

## 2.5 *Candida auris*

*Candida auris* je nově objevený druh. Ukázalo se, že se jedná o nozokomiální patogen, který se obtížně léčí. *C. auris* rychle ovlivňuje pacienty a trvale kolonizuje pokožku. Způsob přenosu kvasinky v nemocnici zatím není jasný. Ze studií vyplývá, že infekce krevního řečiště vznikly u pacientů se zavedeným žilním katetrem, a to až několik týdnů po přijetí pacienta. Infekce vyvolané touto kvasinkou jsou terapeutickou výzvou (8).

Stejně jako ostatní druhy *Candida* může *C. auris* způsobit povrchovou a invazivní kandiózu i infekce krevního řečiště (8).

Faktory virulence jsou podobné jako u *C. albicans*, tedy jako jsou geny a dráhy podílející se na remodelaci buněčné stěny, získávání živin, sekrece enzymů a efluxních pump. *Candida*

*auris* je zvláštní v tom, že je odolná vůči více lékům. Vykazuje odolnost vůči flukonazolu a různou náchylnost k jiným azolům. Je jediným druhem, u kterého se prokázalo, že izoláty jsou rezistentní ke všem čtyřem třídám lidských antifungálních léků. Její multi-rezistentní vlastnosti a obtížná identifikace činí z této kvasinky velkou hrozbu (8).

### **3. Detekce a identifikace mikroorganismů**

#### **3.1 Historie**

Klíčová role mikroorganismů v infekci a nemoci napadající člověka, kterou prokázali Koch a Pasteur a mnoho dalších, poukázala na potřebu správné detekce a identifikace mikrobů. Na konci 19. století došlo k důležitým příspěvkům v diagnostice, většinou souvisejícím s optimalizací kultivačního média a barvicími technikami pro mikroskopii. Některé z těchto metod se stále využívají, jako například barvení podle Ziehl – Neelsen. Vývoj v kultivačních metodách a manipulaci s mikroorganismy v laboratoři vedl k novým biochemickým a fyziologickým studiím. Miniaturizace a mechanizace v oblasti biochemických technik umožnila standardizaci a implementaci. Ve druhé polovině 20. století se jako základní metody pro detekci virů a jiných mikroorganismů ukázaly metody sérologické. V dalších letech se objevila řada imunologických testů, které se dostaly do popředí detekčních metod díky své specifitě, rychlosti a nízkým nákladům. Přes své výhody jsou klasické metody pro detekci a identifikaci bakterií zkreslené kvůli kultivovatelnosti a často nejsou schopny rozlišovat mezi blízce příbuznými kmeny (13).

Během pozdních osmdesátých let, si mikrobiologové uvědomili potenciál metody PCR (polymerase chain reaction neboli polymerázová řetězcová reakce) pro inovativní přístup ke studiu mikrobiálních společenstev nebo pro detekci a identifikaci mikroorganismů v rozmanitých a složitých prostředích. Na rozdíl od běžných kultivačních technik identifikace umožňují techniky založené na PCR identifikaci mikroorganismů bez ohledu na jejich kultivovatelnost. Polymerázová řetězcová reakce je často doplněná sekvenčním nebo hybridizačním profilem, k odvození taxonomické a mikrobiální rozmanitosti nebo detekci a identifikaci pomocí genomových markerů (13).

Výskyt oportunních kvasinkových infekcí u lidí v posledních letech roste. Tyto infekce je velmi obtížné léčit a diagnostikovat, zejména kvůli velké rozmanitosti druhů. Obtížná léčba

je taky z důvodu vzniku rezistence vůči jednomu nebo několika antifungálním lékům. Vznik rezistence výrazně omezuje terapeutické možnosti. Vzhledem k těmto problémům je potřeba rychlé detekce a identifikace infekčních mikroorganismů. Dosavadní metody pro identifikaci druhů postrádají citlivost a specifitu a často vyžadují předchozí kultivaci infekčního agens, což oddaluje diagnostiku. Klasická diagnóza kandidózy je založena na mikroskopii nebo biochemických přístupech. Tyto metody vyžadují izolaci a kultivaci infekčního agens z klinických vzorků, což je proces, který u běžných patogenních kvasinek trvá přibližně 48 hodin někdy i více. Identifikační postupy vyžadují zvláštní odbornost, mohou poskytovat nejednoznačné výsledky a jsou časově náročné. Z tohoto důvodu roste zájem o vývoj alternativních metod založených na přímé detekci diagnostických molekul. Tyto přístupy označené jako molekulární diagnostika zahrnují vysoce výkonné technologie, jako je sekvenování nové generace, detekce specifických sekvencí DNA, detekce RNA nebo proteomika. Od klasické diagnostiky se liší specifitou, přesností a rychlostí. Jejich nevýhodou je ovšem vysoká cena nákladů (12,13).

### **3.2 Identifikační metody *Candida* spp.**

V současné době existuje celá řada identifikačních postupů *Candida* spp. z klinických vzorků. Mezi tyto tradiční metody patří například germ-tube test a morfologické studie. Metody identifikace druhů *Candida* jsou založeny na morfologických a fyziologických vlastnostech.

Přesná identifikace všech izolátů z klinických vzorků je však často složitá a časově náročná. Z tohoto důvodu bylo vyvinuto několik manuálních a automatizovaných rychlých systémů pro identifikaci rodu *Candida*.

Byly vyvinuty nové techniky molekulární typizace, které umožňují přesnou a rychlou identifikaci druhů *Candida*. Významného pokroku bylo dosaženo pomocí různých studií fenotypových charakteristik těchto druhů s využitím komerčně dostupných identifikačních systémů (17).

#### **3.2.1 Fenotypové metody**

Fenotypové identifikační metody jsou efektivní a praktické postupy pro běžnou diskriminaci orálních izolátů v mikrobiologické laboratoři. Vzhledem k variabilitě fenotypových charakteristik a dalším nepravdělnostem v taxonomii se však identifikace

založená na tradičních metodách stala méně spolehlivou. Významného pokroku se dosáhlo pomocí různých studií fenotypových charakteristik těchto druhů s využitím komerčně dostupných identifikačních systémů (17).

### 3.2.1.1 Rychlé komerční systémy

Tyto komerční metody často představují miniaturizovanou verzi testů, což umožňuje pohodlnější a rychlejší identifikaci druhů *Candida* (17).

#### System API 20 C

Identifikace API 20 C systémem je založena na 19 testech asimilace sacharidů. Proužky se inkubují při 30 °C na plastové inkubační misce a poté se po 24, 48 a 72 hodinách odečte přítomnost růstu *Candida* spp. Pro úplnou identifikaci byly někdy vyžadovány další testy, jako je mikroskopická morfologie na agaru kukuřičné mouky (15, 17).

#### System API Candida

System API (analytical profile index) *Candida* se skládá z deseti zkumavek, které umožňují provedení 12 identifikačních testů: pět testů sacharidů jako je glukóza, galaktóza, sacharóza a podobně. Také umožňuje provedení sedmi enzymatických testů. A to konkrétně  $\beta$ -maltosidáza,  $\alpha$ -amyláza,  $\beta$ -xylosidáza,  $\beta$ -glukuronidáza, hydrolýza močoviny, N-acetyl- $\beta$ -glukosaminidáza a  $\beta$ -galaktosidáza.

Reakce jsou vizuálně zvýrazněny spontánními barevnými změnami, bez přidání činidel, jak v mnoho systémech API. Druhy, které tento systém identifikuje s největší pravděpodobností správně bez doplňujících testů, jsou *Candida tropicalis* ten tuto kvasinku identifikuje s přesností 86,7 %, *C. parapsilosis* s přesností 89,7 %, *C. glabrata* a *C. albicans* identifikuje systém API *Candida* s přesností 96,8 % a 96.9 % (15, 17).

### 3.2.1.2 Chromogenní komerční systémy

#### CHROMagar Candida systém

CHROMagar *Candida* je selektivní a diferenciální médium pro izolaci a identifikaci tří druhů *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* a *C. krusei*. Po uplynutí inkubační doby 24–48 hodin vznikají barevné kolonie štěpením chromogenních substrátů. Na tomto médiu rostou kolonie *C. albicans*, *C. tropicalis* a *C. krusei*. *Candida albicans* roste v zelenomodrých koloniích.



Kovově modré kolonie s růžovou halo jsou typické pro *Candida tropicalis*. Růžový růst na agaru je určující pro *C. krusei* (17).

#### Agarový systém BiGGY

BiGGY agar (Bismuth Sulphite Glucose Glycine Yeast Agar) je chromogenní médium, které vede k produkci hnědých až černých kolonií extracelulární redukcí siřičitanu bismutitého na sulfid bismutu. Kmeny *Candida albicans* a *Candida tropicalis* rostou jako světlé až tmavě hnědé kolonie, tyto kmeny se od sebe těžko odlišují.

Další kvasinka, která roste na BiGGY agaru je *C. krusei*, ta roste ve velkých, drsných tmavě hnědých koloniích ohraničených žlutou zónou. Další kvasinku, kterou je možné identifikovat, je *Candida parapsilosis*. Ta na tomto agaru roste ve světle hnědozelených koloniích (17).

### **3.2.2 Metody molekulární identifikace a detekce**

Metody molekulární identifikace se stávají populární díky své vysoké přesnosti, specifitě, citlivosti a nízké míře vzniku falešně pozitivních nebo negativních výsledků. Používají se pro identifikaci a diferenciaci *Candida albicans* od jiných druhů *Candida* (5, 16, 17).

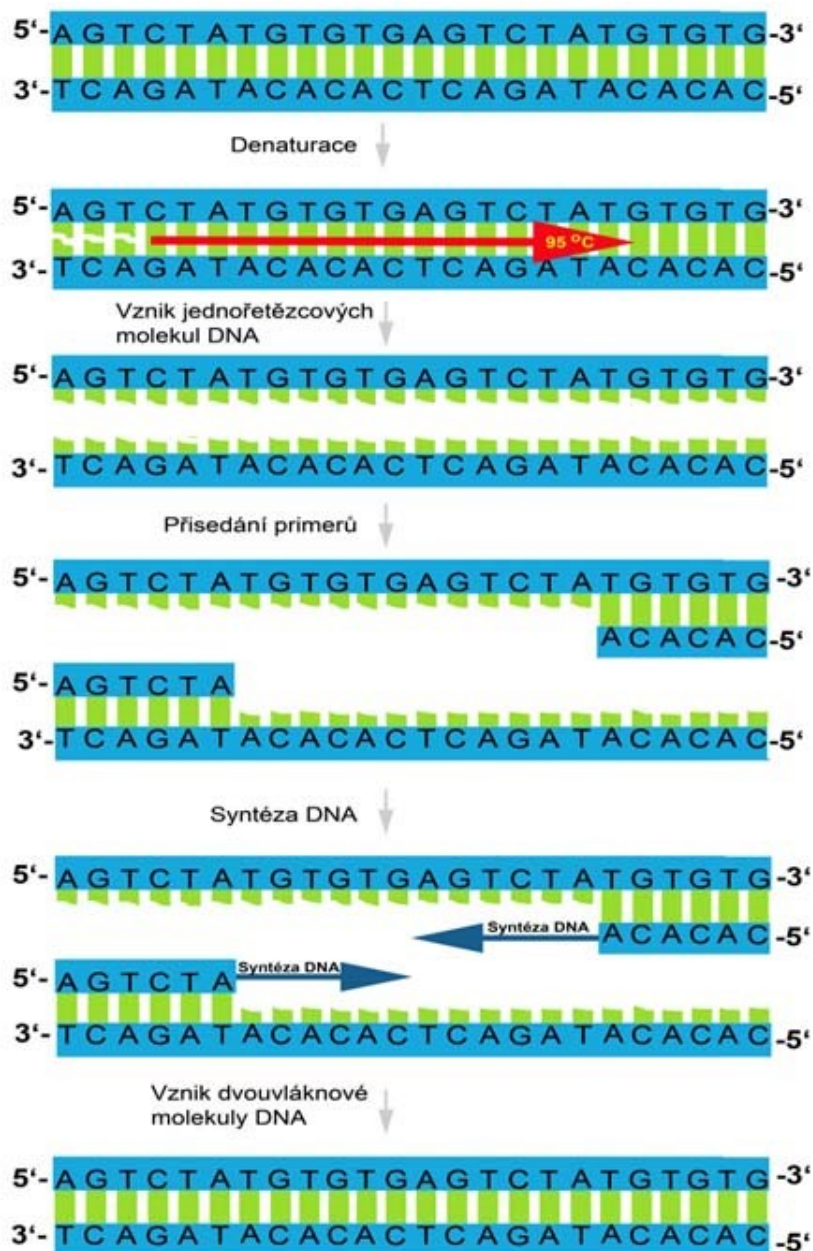
#### **3.2.2.1 Polymerázová řetězcová metoda (PCR)**

Metoda zavedená v roce 1985 využívající mimobuněčné prostředí k množení definovaných fragmentů DNA, výrazně usnadnila molekulární analýzu DNA a genů. Polymerázová řetězcová reakce neboli PCR je metoda velmi rychlá a citlivá, navíc plně automatizovaná, vhodná k amplifikaci úseků DNA i v případě velmi malého množství výchozího materiálu (5, 16, 17).

Standardní PCR je postup *in vitro*, který slouží k namnožení úseků DNA. K použití tohoto postupu je zapotřebí znát krátké nukleotidové sekvence ohraničující danou zkoumanou sekvenci. PCR se skládá v průměru z 25 až 30 cyklů. Každý cyklus je složen ze tří reakcí, které probíhají za určitých teplot a po určitou dobu. Všechny tyto kroky probíhají v přístroji zvaném termocykler. Jeden cyklus PCR trvá přibližně 1 až 5 minut.

Pro zahájení syntézy DNA jsou nezbytné dva oligonukleotidové primery o velikosti zhruba 15–25 bp. Tyto primery se na základě komplementarity vážou ke 3' koncovým sekvencím množeného úseku DNA. Metodu PCR vyvinul Kary Mullis a v roce 1993 za ni získal Nobelovu cenu za chemii (5, 16).

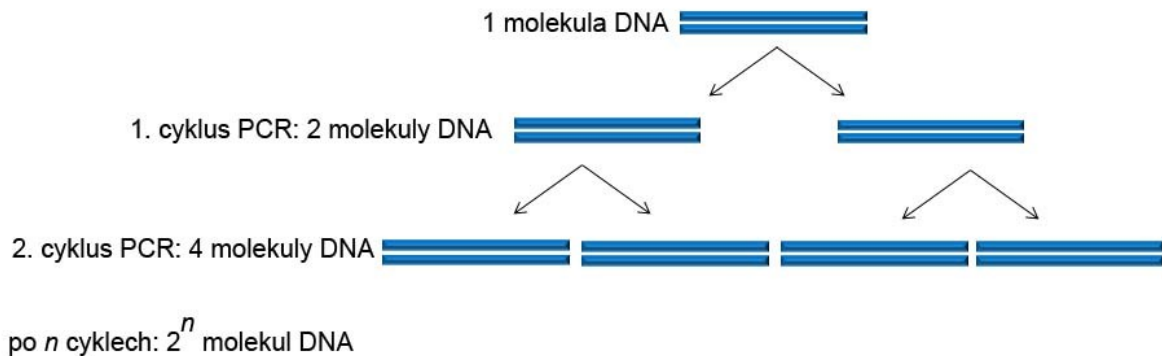
V průběhu každého cyklu se dvouvláknová molekula DNA denaturuje (viz. obrázek 4), tímto procesem se rozdělí na dvě jednořetězcová vlákna. Každé vlákno slouží jako vzor neboli templát pro syntézu nového řetězce. Při procesu denaturace se DNA zahřívá při teplotě kolem 95 °C. Při této teplotě dochází k rozpadu vodíkových vazeb a DNA se rozdělí z dsDNA na ssDNA. Dalším krokem je hybridizace, která probíhá při nižší teplotě. Tento proces probíhá nejčastěji při 50–60 °C. V tomto kroku je denaturovaná DNA hybridizována s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů. Ideální teplota pro nasednutí primeru závisí na tom, z kolika a z jakých bází jsou složeny. Ve třetím kroku je použita DNA-polymeráza pro replikaci úseku DNA mezi místy komplementárními k primerům (5, 16, 17).



**Obrázek 4** Schéma jednoho cyklu PCR.

První část je denaturace DNA. Z tohoto procesu vzniknou dvě jednořetězcová vlákna DNA. Poté následuje proces nesednutí primerů a následná syntéza DNA. Na konci vzniknou dvě nové úplné molekuly (20).

Primer poskytuje volnou 3'OH skupinu potřebnou pro kovalentní navázání nukleotidu a následné prodloužení řetězce. Optimální teplota pro průběh třetího kroku se pohybuje mezi 70 až 72 °C. Jedna dvoušroubovice DNA dá po jednom replikačním cyklu vznik 2 dvoušroubovicím, po dvou 4, po třech 8, po čtyřech 16. Amplifikace je exponenciální proces (viz obrázek 5). Po 30 cyklech vznikne více než miliarda kopií sekvence DNA (5, 16, 17).



**Obrázek 5** Schéma amplifikace molekuly DNA metodou PCR (20).

Z počátku funkci replikázy plnila DNA–polymeráza I izolovaná z *Escherichia coli*. Tento enzym se během denaturace DNA inaktivuje teplotou, bylo nutné ho během třetího kroku v každém cyklu přidat. Vylepšení PCR přišlo s objevem termostabilní DNA–polymerázy z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Tato polymeráza, nazývaná *Tag*–polymeráza, zůstává během denaturačního procesu DNA stále aktivní. Oproti DNA–polymeráze I má tu výhodu, že ji není nutné přidávat, ale místo toho ji můžeme dodat nadbytek. Jednou z nevýhod *Tag*–polymerázy je, že nevykazuje 3′→5′ korekční aktivitu a následkem toho vznikají replikační chyby. Pokud je požadována větší přesnost, je třeba použít teplotně stabilní polymerázy, které vykazují korekční aktivitu 3′→5′. Mezi takové patří *Pfu*–polymeráza izolovaná z *Pyrococcus furiosus* nebo *Tli*–polymeráza získaná z *Thermococcus litoralis*. Další nevýhoda je to, že úseky DNA dlouhé více než tisíc nukleotidů amplifikuje neúčinně. Jestliže je třeba amplifikovat dlouhé úseky, dá se použít *Tfl*–polymeráza z bakterie *Thermus flavus*. Fragменты nad 35 kb nelze metodou PCR účinně amplifikovat. Metoda PCR je technologie velmi flexibilní a umožňuje řadu modifikací. Mezi takové modifikace patří například multiplexní PCR (multiplex–PCR), vnořená PCR a PCR v reálném čase (5, 16, 17).

Navrhnutí primerů pro polymerázovou řetězcovou reakci je složitý proces, který vyžaduje velké znalosti stavby DNA a pořadí nukleotidů. Pro standardní PCR se navrhuje primery v párech. Primery se navrhuje podle sekvence horního vlákna. Přední (forward) primer umožňuje syntézu horního vlákna podle spodního vlákna. Zadní (reverse) primer umožňuje syntézu dolního vlákna podle templátového horního vlákna (20).

### 3.2.2.2 Metody založené na PCR

Nástup metod založených na PCR byl základem pro pokrokovou technologii molekulárních testů pro identifikaci druhů *Candida*. Tyto metody jsou založeny na amplifikaci a detekci mikrobiální nukleové kyseliny na pozadí hostitelské DNA. Technologie založené na PCR zjednoduší mnoho aplikací, které vyžadují velké množství specifických sekvencí (17).

Většina zavedených diagnostických testů pro identifikace kvasinkových infekcí je založena na kultivačních metodách. Kultivační postupy jsou časově náročné a pracné mnohdy neprůkazné. Nedávné studie ukazují pokroky v molekulárních technologiích, jako jsou kvantitativní testy v reálném čase (qPCR).

Mezi vybrané cílové sekvence patří nejběžněji používaná nukleární ribozomální DNA neboli rDNA. V rDNA existuje tandemově opakující se sekvence, a to první a druhá interní transkribovaná spacerová oblast ITS1 a ITS2. Téměř dvě desetiletí se oblast ITS používá jako tzv. čárový kód houbové DNA. Amplifikace a sekvenování interního transkribovaného spaceru lokusu rDNA bylo stanoveno jako mezinárodní zlatý standard pro identifikaci druhů hub. Bylo prokázáno, že sekvence ITS poskytuje spolehlivé druhově specifické genetické markery pro houbové patogeny. Sady primerů zaměřené na sekvence konzervovaných oblastí kódující rDNA jako je 18S, 28S nebo 5,8S, které lemují ITS1 nebo ITS2, mohou amplifikovat rDNA z *Candida* spp. Následně lze amplikony (produkty amplifikace DNA) obsahující druhově specifické primery ITS od sebe odlišit použitím druhově specifických sond TaqMan nebo analýzou křivky tání (22, 23).

#### Multiplex-PCR

Multiplexní PCR je modifikace PCR, která umožňuje amplifikaci více lokusů současně. V multiplexní PCR je v reakční směsi přítomno více párů specifických primerů komplementárních k cílovým sekvencím.

Tato metoda kombinuje různé druhově specifické primery v jedné zkumavce, což je obrovskou výhodou z klinického hlediska. Nejběžnějším problémem je možnost hybridizace primerů mezi sebou. Tato metoda je založena na amplifikaci dvou fragmentů z oblastí ITS1 a ITS2 kombinací s kvasinkově specifickými a osmi druhově specifickými primery v jedné PCR reakci. Sekvence univerzálních primerů ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') a ITS2 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'). Oblast nukleární ribozomální interní

transkribované mezery ITS poskytuje spolehlivé druhově specifické genetické markery pro houbové patogeny.

Kromě těchto dvou univerzálních primerů se v multiplexní PCR vyskytují specifické primery například pro *Candida albicans* jako je Ca3 (5'-GGT TTG CTT GAA AGA CGG TAG-3') a Ca4 (5'-AGT TTG AAG ATA TAC GTG GTA G-3'). Tato metoda umožňuje identifikaci osmi klinicky relevantních druhů *Candida*. Konkrétně se jedná o *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* a *C. guilliermondii* (16, 17, 18, 19, 23).

#### Vnořená PCR

Postup vnořené PCR byl uzpůsoben pro použití při detekci druhů *Candida*. Tato metoda se skládá ze dvou sad primerů (viz. tabulka 2) pro specifickou amplifikaci DNA *Candida* spp., které se používají ve dvou po sobě jdoucích cyklech PCR. Tato modifikace PCR vede ke zlepšení specifity a citlivosti identifikace *Candida* spp. Druhá sada má za cíl amplifikovat cílový produkt z prvního cyklu. Vnořená PCR je používána pro snížení amplifikace neočekávaných vazebných míst primerů (17, 21,)

<b>Primery</b>	<b>Sekvence (5' → 3')</b>
<i>Candida albicans</i> 1/2	F–TTTATCAACTTGTCACACCAGA R–ATCCCGCCTTACCACTACCG
<i>Candida glabrata</i> 1/2	F–TTATCACACGACTCGACACT R–CCCACATACTGATATGGCCTACAA
<i>Candida tropicalis</i> 1/2	F–CAATCCTACCGCCCAGAGGTTAT R–TGGCCACTAGCAAAATAAGCGT
<i>Candida parapsilosis</i> 2/3	F–GCCAGAGATTAAACTCAACCAA R–CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC
<i>Candida krusei</i> 2/3	F–ACTACACTGCGTGAGCGGAA R–ACTACACTGCGTGAGCGGAA
<i>Candida lusitane</i> 1/2	F–GCGATACGTAGTATGACTTGCAG R–GATATTTTCGGAGCAACGCCTAACC
<i>Candida pelliculosa</i> 1/2	F–GAACTTTGCTTTGGGTGGTGAG R–CTTCATCGTTGCGAGACCAAG

**Tabulka 2** Primery používané při multiplexní vnořené PCR v procesu detekce druhů *Candida* (21).

### PCR v reálném čase

PCR v reálném čase je modifikací klasické PCR. Tato metoda umožňuje kvantifikaci amplifikované DNA v reálném čase v každém cyklu. Na rozdíl od klasického PCR se v real time PCR zaznamenává každý cyklus PCR v reálném čase. Technologie real time PCR prokazuje svou univerzálnost v různých oblastech výzkumu jako je biomedicína, mikrobiologie, farmakologie a biotechnologie. Uplatňuje se při kvantifikaci a genotypizaci patogenů, genové expresi, ověřování účinnosti léků a forenzních studiích.

Přístroj pro qPCR se skládá z tepelného cyklovače s integrovaným zdrojem excitačního světla jako je lampa, laser nebo LED dioda. Další částí přístroje je systém detekce fluorescence (fluorimetr) a software, který zobrazuje data jako křivku amplifikace DNA (24, 17).

Záznam amplifikace je znázorněn fluorescenčními metodami za použití sond značených fluoroforem nebo za pomoci interkalačních barviv interagujících s dsDNA. Použití barviv jako je například SYBR Green je levnější než použití sond, ale mají značnou nevýhodu, a to že se nespecificky vážou na dvouvláknovou DNA (dsDNA).

Druhá skupina využívá fluorofory připojené k oligonukleotidům a detekuje pouze specifické produkty amplifikace na rozdíl od prvního přístupu používání barviv. Druhý přístup byl dále rozdělen do tří podskupin podle typu fluorescenčních molekul přidaných do reakce. První podskupinou jsou sondy působící jako primery. Druhou podskupinou jsou hydrolyzační a hybridizační sondy. Hydrolyzační sondy emitují fluorescenční záření po degradaci během prodlužovací fáze molekuly DNA. Hybridizační sondy dávají fluorescenční signál při vazbě na cílovou strukturu DNA během amplifikace. Třetí podskupinou jsou analogy nukleových kyselin. Použité sondy se přímo vážou na komplementární sekvence a poskytují tak vnitřní specifitu (24, 17).

Pro identifikaci *Candida* spp. byly vyvinuty nové postupy qPCR. Mezi tyto postupy patří například TaqMan test, jehož hlavní výhodou je to, že umožňuje rychlou specifikaci několika druhů *Candida*, včetně *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* a *C. glabrata* (24, 17).

#### Analýza polymorfismů délky restrikčních fragmentů

Polymorfismus je označení pro stav, kdy v populaci existují pro určitý znak minimálně dvě varianty genetické informace. Genetický polymorfismus může vzniknout následkem bodové mutace. Tato mutace může vést ke změně produkce určitého proteinu. Dochází k záměně pořadí nukleotidů a následkem toho dochází k zařazení jiné aminokyseliny. Polymorfismy mohou vznikat i zcela náhodně takzvaným genetickým driftem (náhodný posun ve frekvenci alel).

Možnost klonovat a sekvenovat jakýkoliv gen nebo sekvenci DNA z jakýchkoliv druhů, je dána existencí speciálních enzymových skupin. Tato skupina enzymů se obecně nazývá restrikční endonukleázy. Restrikční endonukleázy jsou produkty různých mikroorganismů a rozeznávají různé specifické sekvence nukleotidů. Jejich biologickou funkcí je chránit genetický materiál bakterií před invazí cizích molekul DNA. Štěpná místa v DNA organismu



musí být chráněna před štěpením vlastními restrikčními endonukleázami. Restrikční endonukleázy objevil v roce 1970 Hamilton Smith a Daniel Nathans (16, 24).

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) využívá skutečnosti, že rozdíly v sekvenci lze po štěpení restrikčními endonukleázami identifikovat. Tento přístup se používá v kombinaci s PCR po amplifikaci požadovaných fragmentů. PCR – RFLP se používá pro identifikaci druhů *Candida*, jako jsou *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* a *C. thermophila*. Analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů vyžaduje velké databáze, které nejsou dostupné v klinické rutinní praxi (16, 24).

### **3.3 Detekční metody *Candida* spp.**

Detekční metody zahrnují metody používané k detekci konkrétního taxonu definovaného jako cíl detekce. V mikrobiální praxi se často pojem detekce zaměřuje za identifikaci a naopak. Taxonomickou identifikaci mikroorganismu nelze považovat za detekční postup, protože nebyl stanoven cíl detekce před analýzou (24, 25).

Diagnostická mikrobiologie je široké označení detekčních a identifikačních postupů mikroorganismů. Tyto metody se často používají v klinické mikrobiologii, epidemiologii mikroorganismů, rostlinné patologii a potravinové mikrobiologii.

V mikrobiologických studiích se často používají metody typizace, a to typizace multilokusových sekvencí (MLST) nebo jedno-nukleotidové polymorfismy (SNP). Tyto metody často vyžadují předběžnou identifikaci druhu tradičními metodami založenými na kultivaci (24, 25).

Metody založené na DNA fingerprintingu jsou užitečné pro studium rozmanitosti ve složitém prostředí nebo pro sledování epidemiologických zdrojů. Tyto metody založené na DNA fingerprintingu nejsou vhodné jako detekční a identifikační metody. Diagnostické metody založené na PCR se běžně v klinické praxi využívají, ale jejich spolehlivost je závislá na přípravě pozitivních a negativních kontrol. Stále častěji se používají metody hybridizačního profilování jako detekční techniky (24, 25).

### Hybridizační profilování DNA

V porovnání s metodami založenými na technologii PCR jsou techniky hybridizace používané k detekci molekulárních markerů pracnější, časově náročnější a nákladnější.

Hybridizace může mít v genetice více významů. První je proces spojování dvou komplementárních vláken DNA podle pravidel párování bází. Tímto procesem funguje hybridizace specifické sondy s vyšetřovaným vláknem. Druhý proces je proces křížení různých jedinců. Pro bakteriální diagnostiku se více používá hybridizace DNA, protože umožňuje současnou detekci vysokého počtu DNA signaturních sekvencí. Metoda hybridizace spočívá v barvení cílové DNA flourochromem a hybridizaci na sklíčku (tzv. microarray), které obsahuje desítky až tisíce imobilizovaných sond DNA. Byly navrženy různé typy microarray pro detekci rozsáhlé škály mikroorganismů (24, 25).

### Hybridizace podle Southerna

Tato metoda je pojmenována po E. M. Southernovi, který tuto metodu vynalezl v roce 1975. Jde o velmi citlivou metodu, která je schopna zachytit jeden nebo více úseků DNA ve směsi DNA sekvencí. Existuje mnoho modifikací této metody. Jedna z těchto modifikací, která detekuje místo DNA RNA molekulu, je Northern blot. Další modifikací je Western blot, který využívá vazbu mezi proteinem a specifickou protilátkou (5).

Při hybridizaci se molekuly DNA rozštěpí restrikcčními enzymy. Vzniklé fragmenty jsou seřazeny v elektrickém poli, nejčastěji v agarózovém gelu, kde jsou fragmenty seřazeny podle délky. Nejkratší fragmenty putují nejrychleji od záporného pólu ke kladnému. Poté se na gel přiloží membrána, která nasaje separované fragmenty DNA. Nejčastěji se jako membrána používá nitrocelulóza nebo nylonová membrána. Následně se molekula DNA denaturuje a vytvoří se jednovláknová struktura pomocí alkalického činidla. Následuje zakotvení molekuly DNA do membrány pomocí vyšší teploty kolem 80 °C nebo zakotvení pomocí ultrafialového světla. V dalším kroku se membrána nechává inkubovat s jednovláknovou sondou, která je komplementární k úseku, který se snažíme analyzovat. Sonda nasedá na komplementární místo v úseku DNA. Sondy jsou značeny buď radioaktivně, nejčastěji radioizotopem fosforu nebo neradioaktivním značením pomocí digoxigeninu (5).

### Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)

Princip metody FISH je založen na hybridizaci fluorescenčních sond se specifickými oblastmi DNA mikroorganismů a následné detekci fluorescenčním mikroskopem nebo průtokovou cytometrií (FC= flow cytometry). Sonden použité ve fluorescenční hybridizaci *in situ* mohou být založeny na přírodních nukleotidech, ale nové přístupy využívají analogy nukleových kyselin. Jedná se o chemicky pozměněné nukleové kyseliny modifikované na nukleobáze. Existují různé formy modifikovaných nukleových kyselin, jako je PNA. PNA obsahuje nenabýlý řetězec pseudopeptidů. Takto upravené sondy mohou být využity při diagnostice infekčních onemocnění a detekci mutací související se vznikem rezistence. Tyto sondy oproti tradičním sondám mají jedinečné vlastnosti, jako je odolnost vůči nukleázám, vysokým teplotám a změnám iontové síly.

Pro detekci rodu *Candida* ze vzorku krve byla testována vhodnost sond PNA. Pro identifikaci *Candida* spp. jsou dostupné komerční testy založené na PNA-FISH zaměřené na gen rRNA. Některé tyto komerční soupravy prokázaly senzitivitu větší než 92 %. Ribozomální RNA jsou konzervované a druhově specifické sekvence, které se používají pro klasifikaci organismů. Z důvodu četnosti a druhové specifity byly sekvence rRNA stanoveny jako optimální cíle pro hybridizaci *in situ* (14, 24, 25).

Sondy LNA (locked nucleic acids) jsou syntetické molekuly RNA s modifikovaným ribózovým kruhem, díky tomuto kruhu se zvyšuje afinita ke komplementárním sekvencím DNA nebo RNA. Sonden LNA poskytují vysokou specifitu a citlivost. V klinické praxi nejsou sondy LNA široce používány, ale došlo k slibnému vývoji při detekci různých druhů hub.

Sondy genu 16S rRNA se často používají pro svou specifitu a počet kopií na chromozóm. Počet kopií na chromozómu zvyšuje počet hybridizovaných oblastí.

FISH je rychlá a jednoduchá detekční technika a její aplikace pro diagnostiku bakterií je široce dokumentována (14, 24, 25).

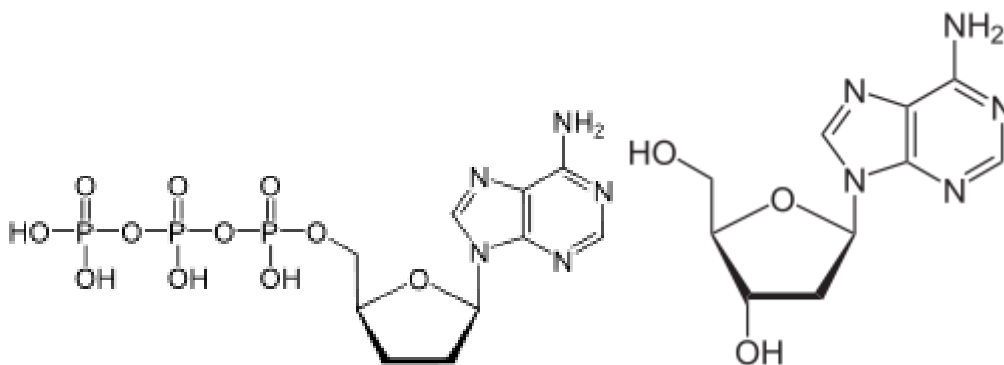
## **4. Detekce a identifikace pomocí sekvenování nové generace**

Sekvenování je genetický termín pro čtení sekvence nukleotidů v molekule DNA. V roce 1977 byly představeny dvě základní metody sekvenování. V genetice tak vznikl významný

mezník v oblasti genetických analýz. Jedna z metod je založena na chemickém štěpení vyvinutém A.M. Maxamem a W. Gilbertem. Druhá metoda je založena na enzymatickém štěpení a byla vyvinutá F. Sangerem a jeho kolegy. Chemické štěpení se již nepoužívá, zatímco Sangerova metoda je velmi rozšířená a oblíbená. Tato metoda se uplatňuje v moderních automatizovaných sekvenačních technikách (5).

#### 4.1 Sangerova metoda

Dideoxy sekvenování DNA je pojmenování Sangerovy metody. Tato metoda je založena na principu ukončení syntézy DNA v okamžiku, kdy se dideoxynukleotid (ddNTP) zařadí na místo deoxynukleotidu. Dideoxynukleotid je analog deoxynukleotidu (viz. obrázek 6), na rozdíl od deoxynukleotidu nemá dideoxynukleotid hydroxylovou skupinu na 3' pozici uhlíku (5).



**Obrázek 6** Struktura dideoxynukleotidu (vlevo) a deoxynukleotidu (vpravo)

Na obrázku vlevo je chemický vzorec dideoxynukleotidu (32) ddATP (dideoxyadenosintrifosfát), kterému chybí OH skupina oproti klasickému deoxynukleotidu dATP (deoxyadenosintrifosfát), který se nachází vpravo, ten oproti ddATP OH skupinu má (33).

V momentě, kdy se dideoxynukleotid zařadí na místo syntézy DNA tak není možné zařazení dalšího nukleotidu. Na začátku syntézy DNA se používá primer ve čtyřech zkumavkách, které obsahují směs určenou k sekvenování. Zkumavka kromě sekvenovací směsi obsahuje jeden ze čtyř dideoxynukleotidů, který je fluorescenčně značen. Konkrétně je-li v jedné ze čtyř zkumavek přítomen například ddATP je syntéza za tímto nukleotidem zablokována. Všechny vzniklé fragmenty mají stejné 5' konce, ale mají rozdílně dlouhé 3' konce, které jsou v případě použití ddATP zakončeny adenosinem. V dalších zkumavkách jsou vlákna ukončena podle použitých dideoxynukleotidů, pokud je v druhé zkumavce použit ddGTP tak je vlákno ukončeno guaninem, ve třetí zkumavce je přítomen ddCTP je 3' konec vlákna ukončen cytosinem a ve čtvrté zkumavce je použit dideoxynukleotid ddTTP kde je vlákno ukončeno thyminem. Vzniklé fragmenty ve zkumavkách lze seřadit podle velikosti za

použití gelové elektroforézy a následně je možné odečíst sekvenci. V současnosti se používají automatizované kapilární elektroforézy (5).

## 4.2 Sekvenování nové generace

Nové pokroky a přístupy v technologiích sekvenování nukleových kyselin přinesly nové poznatky pro výzkum. V současné době existuje celá řada metod sekvenování nové generace. Aplikace NGS (Next Generation Sequencing) se nejdříve uplatnila pro studium lidského genomu, jako je sekvenování celého genomu nebo exomu při vyšetřování rakoviny a diagnostice Mendelianových chorob. Ve zdravotnictví se tyto technologie provádějí jako běžný postup. Nově však dochází k zařazení NGS do laboratoří klinické mikrobiologie, protože pro svoji vysokou přesnost převyšují všechny dosavadní diagnostické postupy. Ačkoliv se většina aplikací NGS soustředí na bakterie a viry, v posledních letech se věnuje pozornost i kvasinkovým infekcím. Sekvenování nové generace tedy přináší diagnostické postupy pro rostoucí hrozbu kvasinkových infekcí. Krom diagnostiky lze sekvenování nové generace také použít při studiu epidemiologického výskytu, obzvláště pro studium vzniku ohnisek. Sekvenování nové generace může poskytnout informace o genomu, proto lze tento postup využít ke stanovení patogenních vlastností, jako je vznik rezistence a virulence. Předchozí studie odhalily, že NGS je možné předpovědět rezistenci na terapii. Schopnost NGS detekovat složitě detekovatelné organismy, které by jinak nalezeny nebyly, podporuje mnohem lepší porozumění a studium lidského mikrobiomu. Detekce organismu za pomoci sekvenování nové generace neznamena, že detekovaný organismus je naživu nebo je dokonce původce onemocnění. Může dojít k detekování mikroorganismu, který se vyskytuje v organismu jako komenzál (24).

Studie mikroorganismů pomocí NGS se řídí dvěma strategiemi. První přístup využívá toho, že fragmenty jsou odděleně namnoženy reakcí PCR a v dalším kroku selektivně sekvenovány. Tento postup se provádí například k identifikaci známých mutantů se vzniklou rezistencí na léky. Druhou strategií je sekvenování celých genomů *de novo*. Tohoto postupu se využívá při identifikaci patogenů nezávislých na kultuře nebo pro charakterizaci mikrobiální populace (24).

### 4.2.1 Technologie sekvenování 454

Technologie 454 je první technologie sekvenování nové generace uvedená na trh. Tato technologie obchází požadavek klonování využitím výhod metody amplifikace DNA *in vitro* zvané emulzní PCR. V této PCR metodě jsou kuličky nesoucí DNA zachyceny do kapiček emulze. Fragmenty se získávají stříháním DNA a jsou na streptavidinové kuličky připojené pomocí adaptérů. Kapičky působí jako jednotlivé reaktory pro proces amplifikace. Kuličky s templátem se pak přenesou do jamek destičky a související klonální templáty se pomocí pyrosekvenční reakce analyzují. Destička umožňuje paralelní provádění statisíců reakcí. Díky této destičce a tomuto postupu se výrazně zvýšila propustnost sekvenování. Pyrosekvenování je sekvenování, při kterém se uvolní anorganický pyrofosfát, který se měří chemiluminiscenční metodou. Templátová DNA je imobilizovaná a do tohoto roztoku jsou po jednom přidávány dideoxynukleotidy, k uvolnění pyrofosfátu dochází kdykoli, kdy je začleněn komplementární nukleotid. Výsledek pyrosekvenování je pyrogram, ze kterého je určena sekvence templátu. Intenzita chemiluminiscenčního signálu je úměrná množství uvolněného pyrofosforečnanu a tím je úměrná i počtu zabudovaných bází. Tento přístup je náchylný k chybám, které vznikají při nesprávném odhadu délky úseků.

Nejmodernější platforma sekvenovací technologie 454 je nabízená společností Roche Applied Science, je schopna generovat rozsáhlé sekvence o velikosti 80–120 Mb a to v poměrně vysoké rychlosti, která je v průměru 200–330 bp za 4 hodiny. Tato technologie je prozatím nejrozšířenější (29).

### 4.2.2 Sekvenování Illumina

Přístup Illumina dosahuje amplifikace DNA bez klonování, a to připojením jednovláknových fragmentů DNA k pevnému povrchu. Pevný povrch je například pole s jednou molekulou nebo průtokovou buňkou. V tomto procesu je jeden konec molekuly DNA připojen k pevnému povrchu za pomoci adaptéru. Molekuly se ohýbají a hybridizují s komplementárními adaptéry a vytváří se můstek, ze kterého tím vzniká šablona pro syntézu komplementárních řetězců. Po kroku amplifikace vzniká průtoková zátka s více než 40 milióny klastry. Každý klastr se skládá z přibližně 1000 klonálních kopií jedné templátové molekuly. Šablony jsou sekvenovány paralelním způsobem pomocí přístupu sekvenování DNA syntézou, kde se využívají reverzibilní terminátory s odstranitelnými fluorescenčními skupinami a speciální DNA polymerázy, které mohou terminátory začlenit do řetězců. Terminátory jsou

označeny fluory, které mají odlišné barvy pro rozlišení bází. Přístup Illumina je účinnější při sekvenování homopolymerních úseků, než je technologie pyrosekvenování, ale produkuje kratší sekvence. Proto přístup Illumina nemůže vyřešit detekci opakování krátkých sekvencí. V tomto přístupu byly zaznamenány chyby substituce v důsledku použití modifikovaných DNA polymeráz a reverzibilních terminátorů. Název sekvenování Illumina je převzat od stejnojmenné společnosti (29).

## 5. Detekce rodu *Candida* pomocí sekvenování nové generace

Jak už bylo zmíněno v kapitole čtyři, tak sekvenování je novodobý přístup, který umožňuje zjistit sekvenci studovaného organismu. U rodu *Candida* se přístup NGS používá pro zjištění vzniku rezistence na antifungální léky. Přesněji se testuje vznik rezistence na echinokandin a azol u klinických izolátů *Candida* spp. V posledních letech jsou stále častěji hlášeny izoláty *Candida* spp. se získanou rezistencí. Proto je testování antimykotické citlivosti a detekce mutací v genech, které způsobí rezistenci, stále důležitější (30, 31).

Mechanismy, jenž se podílí na vzniku rezistence *Candida* spp. na echinokandiny zahrnují mutace v genech FKS. Jedná se o takzvané mutace v oblasti horkých míst. Většina z těchto mutací dává zkříženou rezistenci ke všem třem echinokandinům. Echinokandiny nekompetitivně inhibují enzym glykosyltransferázu 1,3- $\beta$ -D-glukan syntázu (FKS). Tento enzym je odpovědný za biosyntézu oligosacharidu 1,3- $\beta$ -D-glukanu, který je důležitý strukturální prvek buněčné stěny hub. Bodové mutace v horkých místech mohou způsobit snížení afinity echinokandinů k 1,3- $\beta$ -D-glukan syntáze.

Cílem farmakologického účinku azolů je enzym 14- $\alpha$ -demetyláza, tento enzym je důležitý v biosyntéze ergosterolu. Enzym 14- $\alpha$ -demetyláza je kódován genem ERG11. Mutace cíle farmakologického účinku jsou schopné změnit strukturu enzymu a mohou mít za následek snížení afinity k azolům. Získaná rezistence na azoly může vzniknout několika mechanismy. Jako je například zvýšený eflux. Efluxní pumpy často snižují intracelulární akumulaci azolů. Zvýšený eflux je založen na expresi CDR1/CDR2 (*Candida* drug resistance) a MDR1 (multi drug resistance). Geny CDR1/CDR2 jsou transportní geny efluxní pumpy závislé na ATP.

I přes generování značného množství dat má sekvenování celého genomu značné nevýhody, jako je nízká úroveň pokrytí a vysoká zátěž spojená s analýzou dat. Sangerova

metoda také není vhodná z důvodu časově náročného provedení a vysokých nákladů. Vhodné metody sekvenování pro rod *Candida* jsou metody Illumina a Roche 454 (30, 31).



## Závěr

V této bakalářské práci se věnuji detekci a identifikaci rodu *Candida* pomocí sekvenování nové generace. Tato bakalářská práce je zaměřena pouze na teoretický podklad identifikačních a detekčních metod.

V první kapitole se věnuji základnímu popisu kvasinek. V první části této kapitoly jsem se zaměřila na historii a jejich využití v historii. V další části této kapitoly jsem se věnovala jejich struktuře, popisu, obecné charakteristice, rozmnožování a taxonomickému zařazení rodu *Candida*. V poslední části jsem psala o genetické informaci uložené v *Candida* spp. V této části jsem popsala strukturu DNA a genetické rozložení u *Candida albicans*.

Ve druhé kapitole se věnuji popisu jednotlivých vlastností kvasinek z rodu *Candida*. V této části poukazuji na důležité klinické vlastnosti jednotlivých druhů, mezi které patří jejich schopnost napadat člověka. Zaměřuji se na faktory virulence, výskyt v nemocnicích, na to, jak ohrožují pacienta s oslabenou imunitou. V této části popisují druhy rodu *Candida*, mezi ně patří *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* a *C. auris*.

V předposlední kapitole jsem se zaměřila na popis identifikačních a detekčních metod, které se nejčastěji využívají v klinické laboratoři. V první části této kapitoly jsem věnovala pozornost historii a popisu základních identifikačních metod. Zaměřila jsem se na jejich princip provedení a na jejich využití. V další části jsem se zaměřila na molekulární metody. Velkou pozornost jsem věnovala metodě PCR a hybridizační metodě *in situ*. V poslední části této kapitoly jsem se zaměřila na metody sekvenování. Nejdříve jsem popsal metodu podle Southerna, která je klasickou metodou sekvenování. Poté jsem se věnovala popisu metod sekvenování nové generace.

V poslední části této závěrečné práce jsem popisovala sekvenování nové generace u rodu *Candida*. Věnovala jsem se popisu, proč se tato metoda provádí a jaké metody jsou vhodné pro detekci.

## Seznam informačních zdrojů

1. ŠIPICKÝ, MATEJ A JÚLIUS ŠUBÍK. *Genetika kvasiniek: Vysokoškolská učebnica pre posl. biológie,...* Bratislava: Veda, 1992. ISBN 80-224-0396-2.
2. JEDLIČKOVÁ, ANNA, JAROMÍR MAŠATA A MAGDALENA SKOŘEPOVÁ. *Lokální mykózy: průvodce ošetřujícího lékaře.* Praha: Maxdorf, c2008. Jessenius. ISBN 978-80-7345-150-9.
3. *Systémové mykózy: průvodce ošetřujícího lékaře.* Praha: Maxdorf, c2006. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 80-734-5000-X.
4. KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, ANNA. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov.* Bratislava: Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0644-6.
5. PASSARGE, EBERHARD. *Barevný atlas genetiky.* Praha: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-247-3099-8.
6. *Doctorfungus.org: Candida species* [online]. [cit. 2021-03-20]. Dostupné z: <https://drfungus.org/knowledge-base/candida-species/>.
7. SILVA, SÓNIA, MELISSA NEGRI, MARIANA HENRIQUES, et al. *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance.* FEMS Microbiology Reviews [online]. 2012, 36(2), 288-305 [cit. 2021-7-18]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.
8. PRISTOV, K.E., M.A. GHANNOUM, ANTÓNIO MARTINS, et al. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide: quantification, structure and matrix composition. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2019, 25(7), 792-798 [cit. 2021-7-18]. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmi.2019.03.028.
9. SILVA, SÓNIA, MARIANA HENRIQUES, ANTÓNIO MARTINS, et al. Biofilms of non- *Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology* [online]. 2009, 47(7), 681-689 [cit. 2021-7-18]. ISSN 1369-3786. Dostupné z: doi:10.3109/13693780802549594.
10. ODDS, FRANK C, ALISTAIR JP BROWN a NEIL AR GOW. *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome Biology* [online]. 5(7) [cit. 2021-6-21]. ISSN 14656906. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2004-5-7-230.

11. MACCALLUM, DONNA M., LUIS CASTILLO, KERSTIN NATHER, CAROL A. MUNRO, ALISTAIR J. P. BROWN, NEIL A. R. GOW a FRANK C. ODDS. Property Differences among the Four Major *Candida albicans* Strain Clades. *Eukaryotic Cell* [online]. 2009, 8(3), 373-387 [cit. 2021-6-21]. ISSN 1535-9778. Dostupné z: doi:10.1128/EC.00387-08.
12. ARASTEHFAR, A, T BOEKHOUT, G BUTLER, et al. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2019, 43(5), 517-547 [cit. 2021-7-18]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1093/femsre/fuz015.
13. ALBUQUERQUE, PEDRO, MARTA V. MENDES, CATRINA L. SANTOS, et al. DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification. *Science of The Total Environment* [online]. 2009, 407(12), 3641-3651 [cit. 2021-7-18]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2008.10.054.
14. NEPPELENBROEK, KH, RS SEÓ, VM URBAN, S SILVA, LN DOVIGO, JH JORGE a NH CAMPANHA. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Diseases* [online]. 2014, 20(4), 329-344 [cit. 2021-6-27]. ISSN 1354-523X. Dostupné z: doi:10.1111/odi.12123.
15. BERNAL, SAMUEL, ESTRELLAE MARTÍN MAZUELOS, MÓNICA CHÁVEZ, JULIÁN CORONILLA, ANASTASIO VALVERDE, JH JORGE a NH CAMPANHA. Evaluation of the new API *Candida* system for identification of the most clinically important yeast species: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 1998, 32(3), 217-221 [cit. 2021-6-27]. ISSN 07328893. Dostupné z: doi:10.1016/S0732-8893(98)00119-9.
16. Genetika: SNUSTAD, D. PETER, MICHAEL J. SIMMONS, JIŘINA RELICHOVÁ, JIŘÍ DOŠKAŘ, JIŘÍ FAJKUS, PETR HOŘÍN, ALEŠ KNOLL, PETR KUGLÍK, JAN ŠMARDA, JANA ŠMARDOVÁ, RENATA VESELSKÁ a BORIS VYSKOT. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.
17. KH NEPPELENBROEK, RS SEÓS, VM URBAN, S SILVA, LN DOVIGO, JH JORGE, NH CAMPANHA. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral diseases* [online]. 2013, (volume 20, 4), 329-344 [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: doi:10.1111/odi.1212.

18. LAU, ANNA, TANIA C. SORRELL, SHARON CHEN, KEITH STANLEY, JONATHAN IREDELL A CATRIONA HALLIDAY. Multiplex Tandem PCR: a Novel Platform for Rapid Detection and Identification of Fungal Pathogens from Blood Culture Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2008, 46(9), 3021-3027 [cit. 2021-7-2]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00689-08.
19. CARVALHO, A., S. COSTA-DE-OLIVEIRA, M. L. MARTINS, C. PINA-VAZ, A. G. RODRIGUES, P. LUDOVICO a F. RODRIGUES. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species: a Novel Platform for Rapid Detection and Identification of Fungal Pathogens from Blood Culture Specimens. *Medical Mycology* [online]. 2007, 45(7), 619-627 [cit. 2021-7-2]. ISSN 1369-3786. Dostupné z: doi:10.1080/13693780701501787.
20. Lab Guide: Průvodce laboratoří [online]. [cit. 2021-7-5]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/>.
21. TAIRA, CLEISON LEDESMA, THELMA SUELY OKAY, ARTUR FIGUEIREDO DELGADO, MARIA ESTHER JURFEST RIVERO CECCON, MARGARETE TERESA GOTTARDO DE ALMEIDA A GILDA MARIA BARBARO DEL NEGRO. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. *BMC Infectious Diseases* [online]. 2014, 14(1) [cit. 2021-7-5]. ISSN 1471-2334. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2334-14-406.
22. ZHANG, JING, GUO-CHIUAN HUNG, KENJIRO NAGAMINE, BINGJIE LI, SHIEN TSAI A SHYH-CHING LO. Development of *Candida*-Specific Real-Time PCR Assays for the Detection and Identification of Eight Medically Important *Candida* Species. *Microbiology Insights* [online]. 2016, 9(1) [cit. 2021-7-5]. ISSN 1178-6361. Dostupné z: doi:10.4137/MBI.S38517.
23. BLAALID, R., S. KUMAR, R. H. NILSSON, et al. ITS 1 versus ITS 2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources* [online]. 2013, 13(2), 218-224 [cit. 2021-7-18]. ISSN 1755-098X. Dostupné z: doi:10.1111/1755-0998.12065
24. ARASTEHFAR, A, T BOEKHOUT, G BUTLER, et al. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2019, 43(5), 517-547 [cit. 2021-7-7]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1093/femsre/fuz015.

25. ALBUQUERQUE, PEDRO, MARTA V. MENDES, CATARINA L. SANTOS, et al. DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification. *Science of The Total Environment* [online]. 2009, 407(12), 3641-3651 [cit. 2021-7-18]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2008.10.054.
26. DNA [online]. [cit. 2021-7-11]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Double\\_stranded\\_DNA\\_with\\_coloured\\_bases.png](https://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Double_stranded_DNA_with_coloured_bases.png).
27. Biochemie: Nukleové kyseliny. *Moje chemie* [online]. [cit. 2021-7-11]. Dostupné z: [https://www.mojechemie.cz/Biochemie:Nukleov%C3%A9\\_kyseliny](https://www.mojechemie.cz/Biochemie:Nukleov%C3%A9_kyseliny).
28. Transkripce a translace [online]. [cit. 2021-7-11]. Dostupné z: <https://bmedic-online.cz/lekce/transkripce/>.
29. LIU, LIN, YINHU LI, SILIANG LI, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2012, 2012, 1-11 [cit. 2021-7-17]. ISSN 1110-7243. Dostupné z: doi:10.1155/2012/251364.
30. GARNAUD, CÉCILE, FRANÇOISE BOTTEREL, NATACHA SERTOOUR, et al. Next-generation sequencing offers new insights into the resistance of *Candida* spp. to echinocandins and azoles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2015, 70(9), 2556-2565 [cit. 2021-7-18]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkv139.
31. SPETTEL, KATHRIN, WOLFGANG BAROUSCH, ATHANASIOS MAKRISTATHIS, et al. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. *PLOS ONE* [online]. 2019, 14(1), 2556-2565 [cit. 2021-7-18]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0210397.
32. Dideoxynucleotide. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2021-7-18]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dideoxynucleotide>.
33. Deoxyadenosin. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2021-7-18]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Deoxyadenosin>.
34. Kvasinka rozmnožování. *Mikrobiologie* [online]. 2021 [cit. 2021-7-19]. Dostupné z: <https://mikrobiologie.estranky.cz/clanky/kvasinky/rozmnozovani.html>.