

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Molekulárně biologické metody při identifikaci plísni

Bakalářská práce

2020

Kristýna Hošková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna Hošková**
Osobní číslo: **C15407**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Molekulárně biologické metody při identifikaci plísní**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Popište klasické metody, které se používají při identifikaci plísní.
2. Uveďte molekulárně biologické metody využívané k identifikaci mikroorganismů.
3. Z dostupné literatury najděte identifikační metody založené na molekulárně biologických metodách využívaných v praxi pro identifikaci plísní.
4. Na základě literárních údajů srovnajte jednotlivé identifikační metody.

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

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci 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 § 47 b 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, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne:

.....

Kristýna Hošková

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi byli jakkoli nápomocni při psaní mé bakalářské práce. To největší poděkování patří mé vedoucí Ing. Iveta Brožková, Ph.D. za všestrannou pomoc, ochotu a obrovskou trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu během studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou plísni. Zvláštní pozornost je věnována klasickým metodám průkazu a molekulárně biologickým metodám identifikace, které hrají v současnosti stále větší roli.

KLÍČOVÁ SLOVA

Plísně, identifikace, PCR, molekulárně biologické metody

TITLE

Molecular Identification of Fungi

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with problematic of fungi. Subject of greater focus is classic method of demonstration and molecular biological method of identification, which play more significant role in nowadays.

KEYWORDS

Fungi, identification, PCR, molecular biological methods

Obsah

| | |
|--|----|
| Úvod..... | 12 |
| 1 Charakteristika plísní..... | 13 |
| 1.1 Morfologie plísní..... | 14 |
| 1.1.1 Složení buněčné stěny plísní | 15 |
| 1.1.2 Rozmnožování plísní..... | 16 |
| 1.2 Podmínky pro život a růst plísní | 17 |
| 2 Klasické metody při identifikaci plísní..... | 18 |
| 2.1 Mikroskopická metoda..... | 18 |
| 2.1.1 Nativní preparát..... | 18 |
| 2.1.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)..... | 19 |
| 2.1.3 Transmisní elektronový mikroskop (TEM)..... | 20 |
| 2.1.4 Fluorescenční mikroskopie..... | 21 |
| 2.1.5 Barevné preparáty..... | 21 |
| 2.2 Histologická metoda..... | 22 |
| 2.2.1 Barvení pomocí Hematoxylinu a Eosinu (H&E) | 22 |
| 2.2.2 Impregnace podle Grotta | 22 |
| 2.2.3 PAS reakce (Periodic Acid Schiff)..... | 23 |
| 2.3 Kultivační metody | 24 |
| 2.4 Další metody při identifikaci plísní..... | 26 |
| 2.4.1 Elektronické nosy | 26 |
| 3 Molekulárně biologické metody..... | 27 |
| 3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)..... | 27 |
| 3.1.1 Metody založené na náhodně amplifikované polymorfní DNA (RAPD) . | 30 |
| 3.1.2 Repetitivní PCR (rep-PCR)..... | 30 |
| 3.1.3 Nested PCR | 31 |
| 3.1.4 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) | 31 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.1.5 | Metoda založená na PCR v reálném čase..... | 31 |
| 3.2 | Gen Probe Accuprobe test..... | 33 |
| 3.3 | Metody založené na hybridizaci nukleových kyselin | 34 |
| 3.3.1 | Metoda Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) | 35 |
| 3.3.2 | Metody založené na mikročipu | 36 |
| 3.3.3 | Technologie Luminex..... | 37 |
| 3.4 | Metody založené na sekvenování DNA..... | 38 |
| 3.4.1 | Maxam-Gilbertovo a Sangerovo sekvenování | 39 |
| 3.4.2 | 454 sekvenování | 40 |
| 3.4.3 | Illumina sekvenování | 41 |
| 3.4.4 | SOLiD | 41 |
| 3.4.5 | Metody třetí generace..... | 42 |
| 3.5 | Metoda MALDI-TOF MS..... | 43 |
| 3.5.1 | Metoda založena na elektrosprejové ionizační hmotnostní spektrometrii | 45 |
| 3.6 | Test T2 pro magnetickou rezonanci (T2MR)..... | 46 |
| 4 | Patogenita plísní | 47 |
| 5 | Závěr..... | 48 |
| 6 | SEZNAM LITERATURY..... | 49 |

SEZNAM ILUSTRACÍ

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 Fylogenní klasifikace plísň (převzato a upraveno dle Jones, 2017)..... | 13 |
| Obrázek 2 Typy plísňových hyf (převzato a upraveno dle Paráková, 2014)..... | 14 |
| Obrázek 3 Stavba buněčné stěny (převzato a upraveno dle Brown, 2015)..... | 15 |
| Obrázek 4 Schéma rozmnožování plísň (převzato a upraveno dle Characteristics of fungi, 2020)..... | 16 |
| Obrázek 5 Mikroskopické zobrazení nativního preparátu rodu <i>Fussarium</i> spp. (převzato a upraveno dle Vitáčková, 2018) | 18 |
| Obrázek 6 SEM konidií rodu <i>Aspergillus fumigatus</i> (převzato a upraveno dle Gregory, 2020) | 19 |
| Obrázek 7 TEM plísňových hyf uvnitř <i>Aspergillomu</i> (převzato a upraveno dle Beauvais, 2020) | 20 |
| Obrázek 8 Impregnace dle Grotta septálních plísňových hyf rodu <i>Aspergillus</i> (převzato a upraveno dle Yunyoung, 2015)..... | 22 |
| Obrázek 9 PAS barvení septálních hyf plísně <i>Schizophyllum Commune</i> (převzato a upraveno dle Premamalini, 2011) | 23 |
| Obrázek 10 <i>Trichophyton terrestre</i> na SGA (převzato a upraveno dle Aryal, 2019) ... | 24 |
| Obrázek 11 <i>Aspergillus flavus</i> na PDA (převzato a upraveno dle Hamzia, 2018)..... | 25 |
| Obrázek 12 <i>Aspergillus fumigatus</i> na Czapek-Dox médiu (převzato a upraveno dle Tortosa, 2015) | 25 |
| Obrázek 13 Zjednodušené schéma PCR (převzato a upraveno dle Xpresspcr, 2012) | 29 |
| Obrázek 14 Schéma znázorňující umístění oligonukleotidů pro amplifikaci ITS1 a ITS2 (převzato a upraveno dle Choi, 2012)..... | 29 |
| Obrázek 15 Schéma MALDI-TOF MS (převzato a upraveno dle Lima, 2017) | 43 |

SEZNAM ZKRATEK

AGS – amperometrické senzory plynů

bp – páry bází

cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina

CI – chemická ionizace

CISH – chromogenní hybridizace in situ

CP – vodivé polymery

DAPI – 4,6- diamidino-2-fenylidol dihydrochlorid

DDH – přímá hybridizace deoxyribonukleové kyseliny

DHB – 2,5 – dihydroxybenzoová kyselina

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP - 2'-deoxynukleosid 5'-trifosfáty

DP – desorpce plazmou

dsDNA – dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina

ESI – MS – elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie

FISH – fluorescenční hybridizace in situ

FRET – fluorescenční rezonanční přenos energie

CHCA – α -kyano – 4 – hydroxycinnamová kyselina

ISH – hybridizace in situ

ITS1 – interní transkribovaný spacer pro oblast jedna

ITS2 – interní transkribovaný spacer pro oblast dva

KOH – hydroxid draselný

LD – laserová desorpce

MALDI – ionizace laserovou desorpcí za pomoci matrice

MALDI TOF MS – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem

MgCl₂ – chlorid hořečnatý

NGS – metody nové generace

NK – nukleové kyseliny

PAS – kyselina jodistá

PCR – polymerázová řetězcová reakce

PDA – bramborový glukózový agar

PNA – peptidová nukleová kyselina

QMB – polovodiče kovů a oxidu křemíku

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězcová reakce

RAPD – náhodná amplifikace polymorfni deoxyribonukleové kyseliny

RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů

RLU – relativní světelné jednotky

RNA – ribonukleová kyselina

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

S – Svedberg

SA – kyselina sinapová

SAW – povrchová akustická vlna

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

SGA – Sabouraudův glukózový agar

T2MR – test T2 pro magnetickou rezonanci

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

VOC – těkavá organická látka

Úvod

Plísně jsou nedílnou součástí lidského života. Můžeme se s nimi setkat na každém kroku. Kladný přínos lze sledovat například při výrobě potravin nebo antibiotik. Naopak nebezpečí přináší plísně způsobující onemocnění nebo kažení potravin. V posledních letech se zvýšil počet infekčních onemocnění u lidí, které způsobují právě plísně. Pro identifikaci plísní se dlouho používaly klasické metody. V posledních letech se začaly více používat molekulárně biologické metody. Do klasických metod můžeme zahrnout například různé druhy mikroskopii (SEM, TEM), histologické metody, kultivační metody a elektronické nosy.

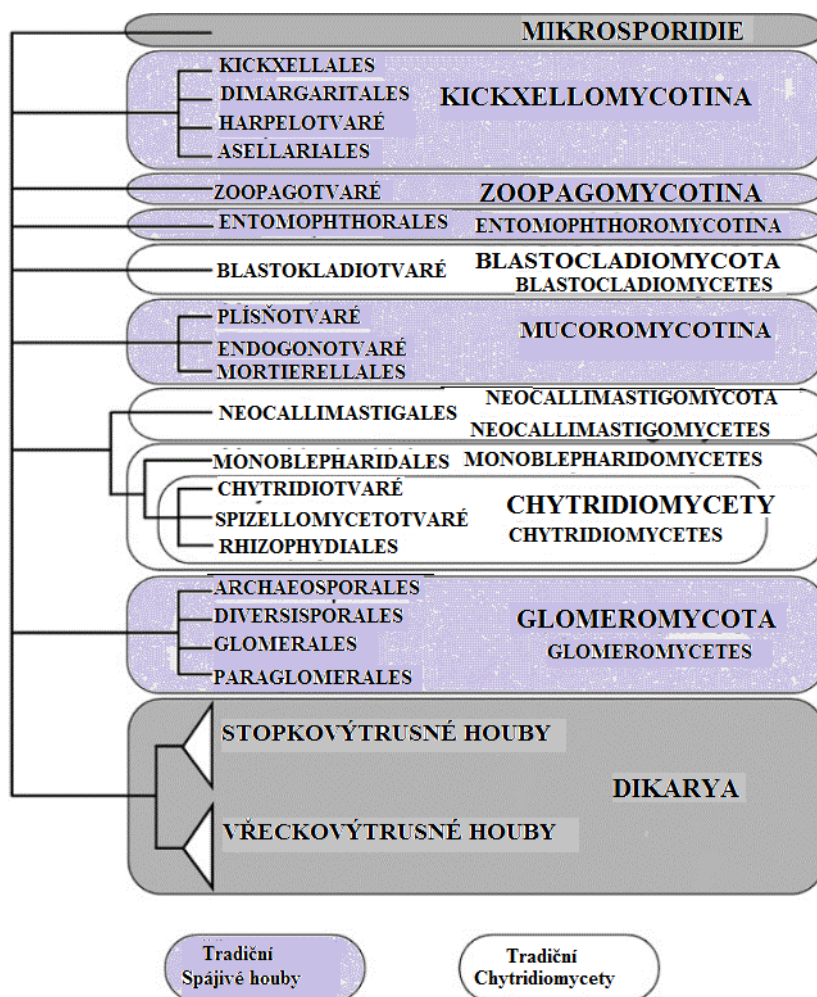
Molekulárně biologické metody jsou založeny na detekci určitých specifických částí DNA. Do těchto metod patří sekvence DNA pomocí PCR a dalších typů PCR, hybridizace nukleových kyselin, sekvenování DNA a metoda MALDI TOF MS.

V bakalářské práci se budu snažit přiblížit obecnou problematiku plísní a jednotlivé metody jejich identifikace.

1 Charakteristika plísní

Plísně jsou mikroskopické eukaryotické mikroorganismy, které rostou vytvářením jednoduchých hyf (Riquelme et al., 2018). Řadí se do samostatné říše hub (Fungi), můžeme k nim přiřadit kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy, které tvoří skupinu tzv. mikroskopických hub (mikromycet). Existuje přibližně 100 000 druhů hub a některé z nich mohou vyvolávat mykózy, příkladem může být *Tinea Pedis* (Blackwell, 2011; Bartnicki – Garcia, 2016).

Plísně mají nejrůznější význam, mohou se používat v potravinářství, ekologii nebo v biotechnologii. Mohou ale být i zdraví škodlivé, způsobují různá onemocnění, která mohou vést až ke smrti (Frey-Klett et al., 2011).

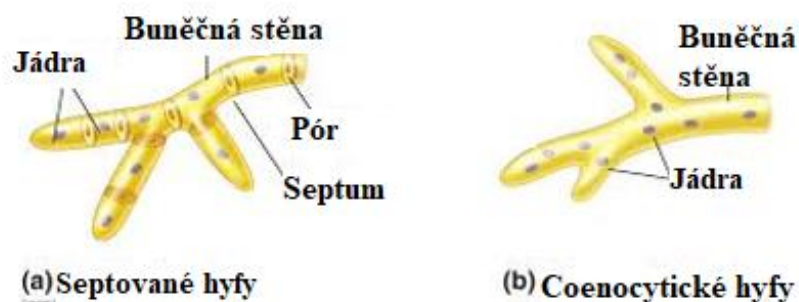


Obrázek 1 Fylogenní klasifikace plísní (převzato a upraveno dle Jones, 2017)

1.1 Morfologie plísní

Vegetativní jednotka růstu vláknitých hub se nazývá hyfa, je to válcová buňka s charakteristickým hrotem (Riquelme et al., 2018). Mezi hyfy se mohou řadit septované hyfy a hyfy coenocytické. Septované hyfy jsou vícejaderné a mají mnohobuněčná vlákna s neúplnými bočními stěnami. Díky tomu, jsou tyto hyfy rozčleněny pomocí přehrádek, lze je označit jako mnohobuněčné. Druhý typ hyf, který žádné přehrádky neobsahuje, nazýváme coenocytické hyfy. Jedná se tak o jednu jedinou buňku s mnoha jádry (Spatafora et al., 2016; Chagnon, 2014; Shahi et al., 2015).

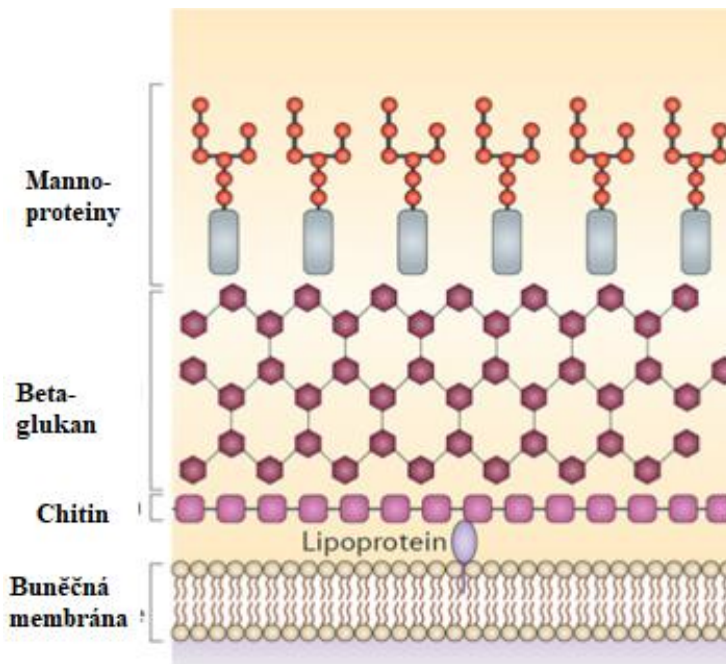
Mycelia vláknitých hub se skládají ze vzájemně propojených hyf, které rostou v jejich vrcholu a rozvětvují se. U mycelia se rozlišuje vzdušné mycelium a substrátové mycelium. U prvního typu mycelia dochází na specializovaných hyfách k tvorbě rozmnožovacích útvarů zvaných spory, ty slouží k rozmnožování plísní. Substrátové mycelium slouží k výživě plísní (Tegelaar a Wösten, 2017; Canale et al., 2017).



Obrázek 2 Typy plísňových hyf (převzato a upraveno dle Paráková, 2014)

1.1.1 Složení buněčné stěny plísní

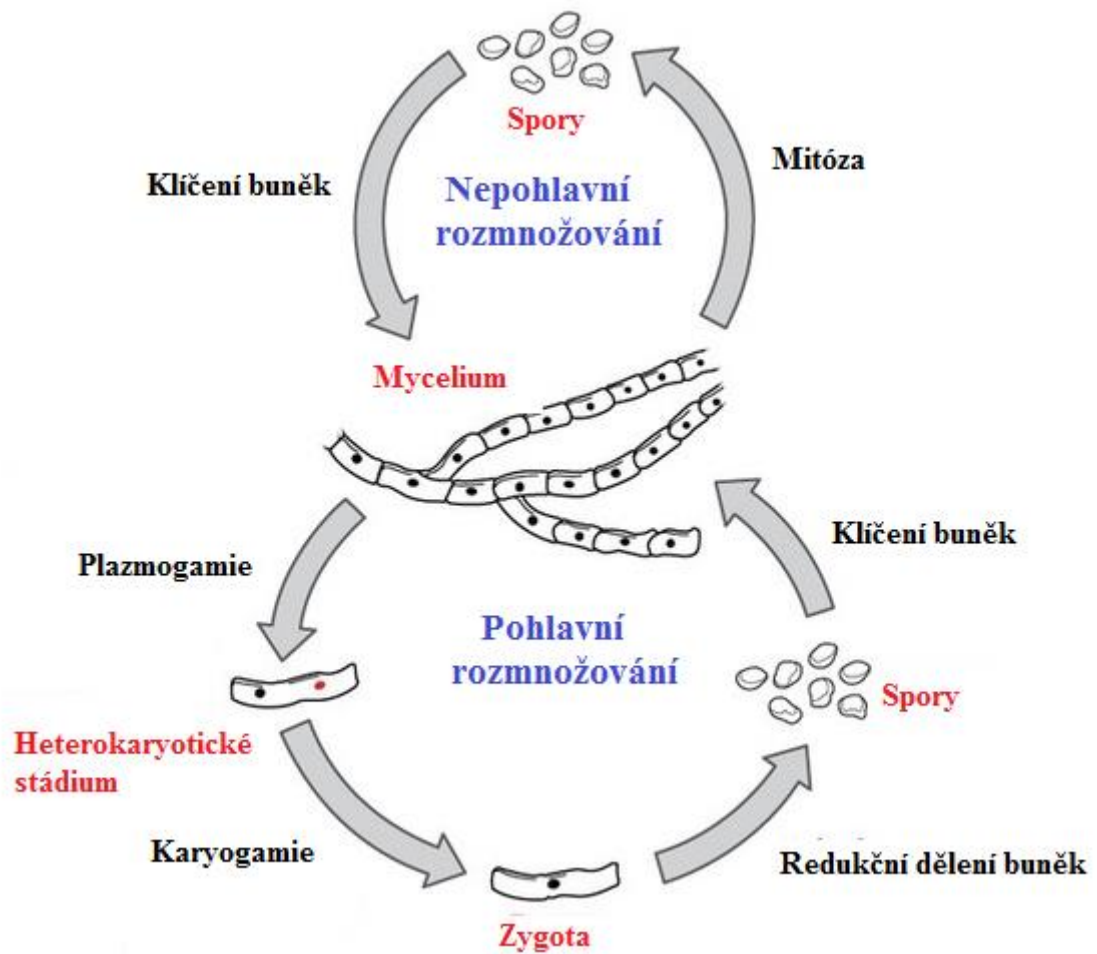
Buněčná stěna je nerozpustný trojrozměrný útvar, který se skládá z 90 % polysacharidů. Mezi polysacharidy, které ji tvoří, řadíme například chitin, glukany a mannany. Buněčná stěna funguje jako exoskelet, stále se mění vlivem modifikace kultivačních podmínek. Pak se hojně vyskytují bílkoviny a lipidy. Kvůli své biologické, biochemické úloze a strukturální organizaci je složení buněčné stěny důležité pro vývoj nových antimykotik (Latgé, 2007).



Obrázek 3 Stavba buněčné stěny (převzato a upraveno dle Brown, 2015)

1.1.2 Rozmnožování plísní

Plísně se rozmnožují pomocí produkovaných spor. Jedná se o nepohlavní, nebo pohlavní způsob rozmnožování. K nepohlavnímu rozmnožování pomocí spor zahrnujeme sporangiospory a konidie. U pohlavního rozmnožování pomocí spor rozlišujeme basidiospory, askospory a zygospory. Plísně produkují určité typy asexuálních spor, jako jsou makrokonidia, mikrokonidia a chlamydo-spory (Snyder et al., 2019; Jung et al., 2014).



Obrázek 4 Schéma rozmnožování plísní (převzato a upraveno dle Characteristics of fungi, 2020)

1.2 Podmínky pro život a růst plísní

Plísně potřebují pro svoji existenci vhodné podmínky, mezi ně patří například teplota a pH. Většina plísní je aerobních, tedy mohou se rozmnožovat a růst pouze v přítomnosti kyslíku. Dále potřebují k životu vlhkost, teplotu okolo 18-28 °C. Zde se mohou vyskytovat i druhy, které mají různé teplotní rozmezí, například to jsou termotolerantní druhy, které mají optimum 20 °C, ale dokážou růst i při 50 °C (Ivarsson et al., 2016; Maheswari et al., 2000).

Plísně rostou v širokém rozmezí pH. Optimální pH se pohybuje v rozmezí 5-7 (Rousk et al., 2009). V přírodě můžeme nalézt druhy plísní, které rostou například na stavebních kamenech, skle a dalších inertních materiálech (Kazemian et al., 2019).

2 Klasické metody při identifikaci plísní

U laboratorního vyšetření plísní je primární kvalitní odběr a zpracování vzorku. Proto je zásadní odebírat vzorek přímo z určeného místa infekce, v určeném množství a předcházet kontaminaci vzorku. U povrchových mykóz se k mykologickému vyšetření posílají kožní šupiny, vlasy a nehty. U ostatních (orgánových či invazivních) mykóz se odebírají vzorky při biopsii, nebo tělesné tekutiny, například krev, moč, likvor, sputum, punktát a hnis (Baron et al., 2013; Veasey et al., 2017).

2.1 Mikroskopická metoda

Přímá mikroskopie byla základem pro diagnostiku mykologických infekcí po mnoho let a stále je to jedna ze základních technik, která se hojně využívá k identifikaci plísní. Využívá se porovnání s atlasem. Mikroskopie je nespolehlivá a nepoužívá se jako primární detekce, protože je často falešně negativní (citlivost <75 %) (Kozel a Wickes, 2014; Buchta et al., 2010).

2.1.1 Nativní preparát

Jedná se o nejčastěji používanou metodu pro identifikaci plísní. Používá se hydroxid draselný (KOH), který pomáhá při vizualizaci polyfyziologických jader, aniž by ovlivňoval chitinózní stěny hub. Konečná identifikace vyžaduje vyškolený a zkušený personál. Tato technika se například používá k vyšetření vzorků kůže a vaginálního sekretu (Buchta et al., 2010; Balajee et al., 2007).

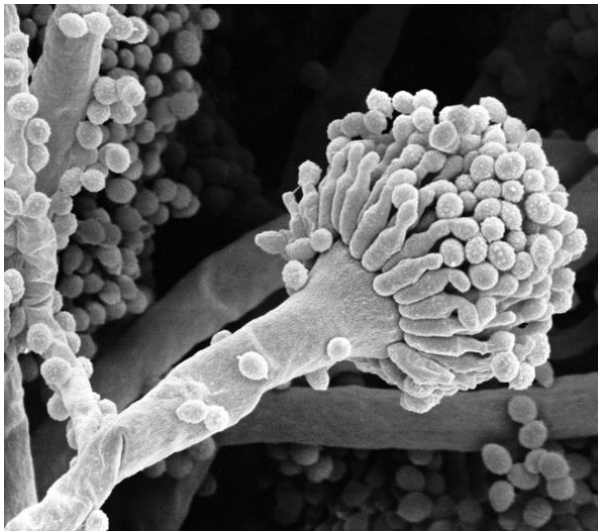


Obrázek 5 Mikroskopické zobrazení nativního preparátu rodu *Fusarium* spp. (převzato a upraveno dle Vitáčková, 2018)

2.1.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Tato metoda je založena na identifikaci houbových druhů, která se provádí na základě morfologických charakteristik jimi produkovaných spor. Principem je, že svazek elektronů je fokusován na vzorek, pak dochází k tvorbě signálů, díky interakci elektronů na povrchu vzorku. Kvůli tomu se daný vzorek skenuje postupně, dokud není obraz zcela kompletní (Babu et al., 2018).

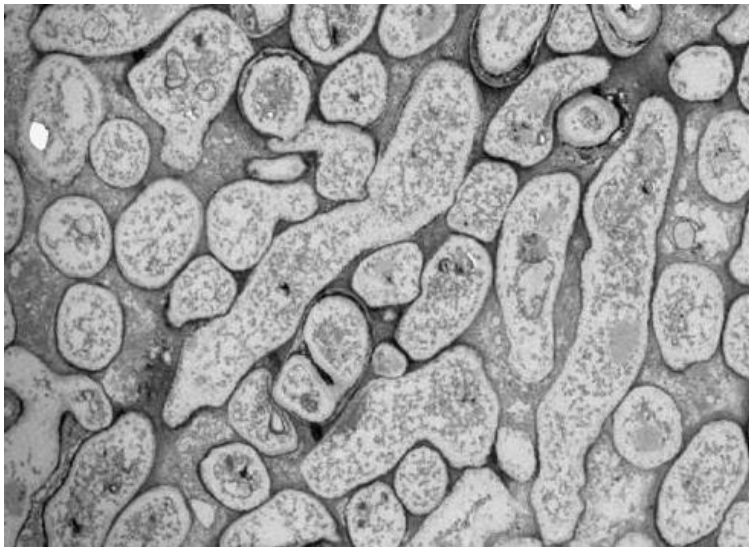
Při přípravě vzorku dochází k fixaci, pak následuje dehydratace a sušení vzorku. Ten se potahuje vodičem, jako je zlato nebo uhlík, kde dochází ke zpracování obrazu, při vysokém vakuu. Tato metoda má několik výhod například zahrnuje dvourozměrný aspekt obrazu s vysokou hloubkou ostrosti, rychlé zpracování a získávání obrazu (Costa-Orlandi et al., 2017; Postek et al., 2016).



Obrázek 6 SEM konidii rodu *Aspergillus fumigatus* (převzato a upraveno dle Gregory, 2020)

2.1.3 Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

Tento typ mikroskopie se využívá v buněčné biologii, a to při identifikaci plísní a jejich morfologických struktur. Princip je takový, že se využívá zrychleného elektronového paprsku, který prochází skupinou magnetických čoček (kondenzátory a objektivy), následně dochází k interakci mezi paprskem a vzorkem, a vznikne obraz. Ten je snímán například filmem nebo digitálním fotoaparátem. Příprava vzorku je podobná jako u SEM, kromě pokovování vzorku. Místo toho se vzorek vkládá do pryskyřice, kde se pozoruje celý v ultratenkém řezu (Attias et al., 2015; Winey et al., 2014).



Obrázek 7 TEM plísňových hyf uvnitř *Aspergillomu* (převzato a upraveno dle Beauvais, 2020)

2.1.4 Fluorescenční mikroskopie

Ke zvýšení citlivosti nativní mikroskopie se používají fluorescenční barviva, příkladem může být Calcofluor, Blankophor, Rylux BSU. Těmi se obarvují struktury buněčné stěny hub (Goenka et al., 2019).

Po obarvení pak můžeme pozorovat obarvené části fluorescenčním mikroskopem dvěma způsoby. První možností je tyto části pozorovat při vlnové délce 430 nm, kdy barevně svítí. Při užití druhé možnosti se používá kratších vlnových délek v oblasti UV záření, kdy látka absorbuje ultrafialové paprsky a emituje vlnové délky viditelného spektra, které poté sledujeme při vlnové délce 370 nm. Při absorpci energie se atomy vybudí na vyšší energetickou hladinu a mají tendenci tuto energii vyzářit a vrátit se zpět do svého základního stavu (Goenka et al., 2019; Schaffrinski, 1999).

Používají se různé komerční fluorospektrometry (SPEX SkinSkan, Edison), které se skládají ze světelného zdroje (Xenon arc lampa), monochromátorů a rozdvojených optických sond (Goenka et al., 2019).

2.1.5 Barevné preparáty

Dále se mohou používat i techniky barvení, například Gram-Weigertovo barvení, které slouží k diagnostice cyst *Pneumocystis jiroveci* a Giemsovo barvení, které je také určeno pro mikroskopickou diagnostiku *Pneumocystis jiroveci* (Gigliotti et al., 2014).

2.2 Histologická metoda

K identifikaci plísní existují různé impregnační a barvicí metody, mezi ně řadíme impregnaci podle Grotta a PAS reakci, H&E barvení.

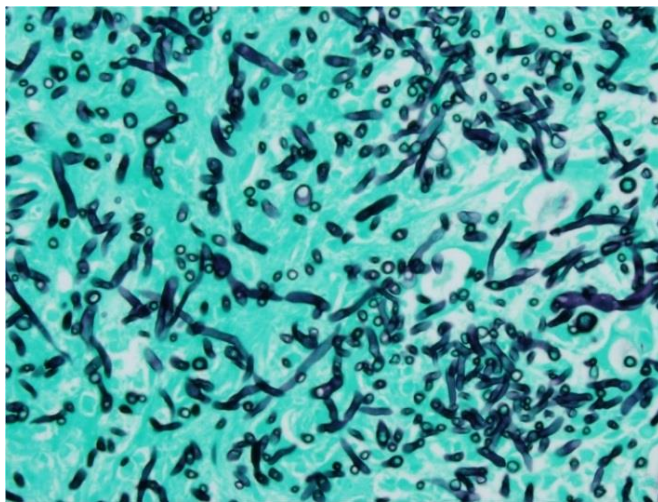
2.2.1 Barvení pomocí Hematoxylinu a Eosinu (H&E)

Toto barvení se používá běžně v patologii pro průkaz plísňových infekcí, které pomáhá identifikovat zánětlivou reakci hostitele. Všechny houby vykazují růžovou cytoplazmu, mají modrá jádra a jsou bez zbarvení buněčné stěny (Guarner a Brandt, 2011).

2.2.2 Impregnace podle Grotta

Impregnační metody využívají látky, které najdeme ve struktuře zkoumaného materiálu a jsou schopny redukovat kovy (Osmium, Stříbro, Zlato) z nestabilních roztoků jejich soli. Impregnace se používá k identifikaci plísní, například *Aspergillus fumigatus* a *Blastomyces dermatitidis*.

Principem této metody je, že dochází k oxidaci polysacharidů v buněčné stěně na aldehydy. Kde aldehydové skupiny přímo redukují ionty stříbra z roztoku dusičnanu stříbrného na viditelné kovové stříbro. Výsledkem barvení jsou černé houby a světle zelené pozadí (Čížková, 2018).

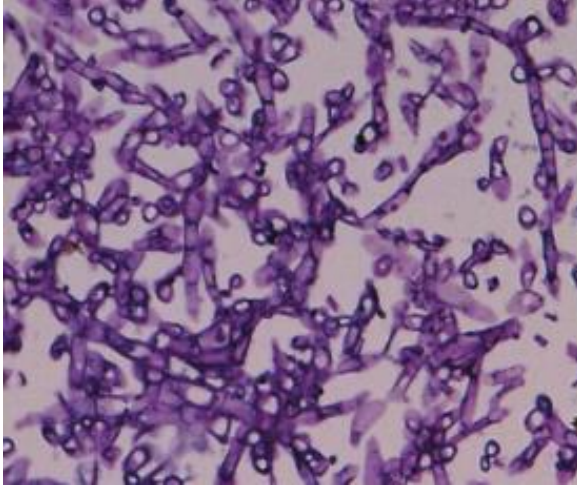


Obrázek 8 Impregnace dle Grotta septálních plísňových hyf rodu *Aspergillus* (převzato a upraveno dle Yunyoung, 2015)

2.2.3 PAS reakce (Periodic Acid Schiff)

Periodická kyselina Schiff detekuje glykogen v tkáních, plísňové stěny obsahují velké množství glykogenu, a proto může být PAS použit pro screening plísňových organismů (Guarner a Brandt, 2011).

Principem této metody je, že dochází k oxidaci polysacharidů na aldehydy kyselinou jodistou. Kde aldehydy následně reagují se Shiffovým reagens za vzniku růžového zbarvení (McGavin, 2014).



Obrázek 9 PAS barvení septálních hyf plísně *Schizophyllum Commune* (převzato a upraveno dle Premamalini, 2011)

2.3 Kultivační metody

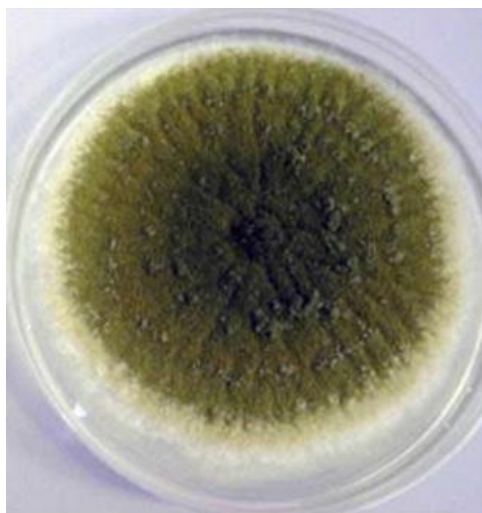
Základní kultivační vyšetření je většinou značně jednoduchou záležitostí, protože mikroskopické houby jsou nenáročnými organismy a jsou schopny růstu prakticky na všech běžných kultivačních médiích. Existuje mnoho obecných typů kultivačních médií, a to například přírodní a syntetické. Přírodní média jsou složena z přírodních substrátů, jako například kukuřičná moučka atd. Do přírodního média se může řadit bramborový dextrózový agar. Na druhé straně syntetická média obsahují složky známého složení. Tyto typy médií lze pokaždé s přesností duplikovat. Obsahují definovaná množství zdrojů uhlohydrátů, dusíku a vitamínů. Do této kategorie spadá Czapek-Doxův agar. Nejvíce používaným médiem je Sabouraudův glukózový agar (SGA). Média obsahující vysoký zdroj uhlohydrátů a zdroj dusíku, jsou požadována pro růst plísní při pH v rozmezí 5 až 6 a teplotním rozmezí od 15 do 37 °C. Samotný růst může trvat až několik týdnů, ale kultury se mohou objevit již po několika dnech (Basu et al., 2015).

Sabouraudův glukózový agar (SGA) obsahuje agar, bakteriologický pepton a obohacuje se antibakteriálními látkami, například aneurinem, chloramfenikolem nebo cykloheximidem. Tyto složky slouží k potlačení růstu bakterií. Optimální kultivační teplota je 28-30 °C (Scognamiglio et al., 2010; Hong et al., 2017).



Obrázek 10 *Trichophyton terrestre* na SGA (převzato a upraveno dle Aryal, 2019)

Další používané médium pro kultivaci plísní je **Bramborový dextrózový agar (PDA)** jde o specifické médium, které se připravuje z extraktu macerovaných brambor naložených do destilované vody. Tekutina se poté sterilizuje a přidává se k ní glukosa, agar, dusík a fosfor (Liu et al., 2002; Griffith et al., 2007).



Obrázek 11 *Aspergillus flavus* na PDA (převzato a upraveno dle Hamzia, 2018)

Další používané médium pro kultivaci plísní je **Czapek-Dox médium** je složeno z glukosy, síranu hořečnatého a železnatého, chloridu draselného a dusičnanu sodného. Existují různé modifikace, kdy se místo glukosy volí různé množství sacharózy (Mellon et al., 2013; Chinedu et al., 2010).



Obrázek 12 *Aspergillus fumigatus* na Czapek-Dox médiu (převzato a upraveno dle Tortosa, 2015)

2.4 Další metody při identifikaci plísní

Existují i další metody pro identifikaci plísní, a to například sérologické nebo analyticko-instrumentální metody (Yeo a Wong, 2002). Nejčastěji používaná metoda je metoda využití Elektronických nosů.

2.4.1 Elektronické nosy

Tato metoda se řadí mezi analyticko-instrumentální techniky. V posledních letech došlo k velkému pokroku v této metodě. Tato metoda byla dříve určena k napodobování savčího čichového systému v přístrojích, které sloužili k identifikaci a klasifikaci aromatických směsí. V dnešní době se tato sensorová metoda (elektronický nos) využívá k identifikaci, detekci a k rozlišování několika typů a zdrojů chemických látek. Dále slouží k určení směsí sloučenin, které jsou součástí těkavých organických látek v ovzduší, včetně samostatně těkavých organických látek (VOC) (Wilson a Baietto, 2011, Bratolli et al., 2011).

Dnes tato metoda zahrnuje řadu elektronických chemických senzorů s určitou specifíčností a správným systémem pro rozpoznávání pachů. Principem je, že u přítomného zápachu dochází k fyzikální změně senzorů, která je rozpoznávána nosiči a následně převedena na elektrický signál. Délka signálu je závislá na určitých parametrech. Například na druhu a koncentraci sloučenin, které vytvářejí určitý sensorický vjem. Dále na typu senzoru apod. Elektronické nosy mají hned několik výhod, a těmi jsou rychlost provedení, nízká cena a snadná použitelnost (Hu et al., 2019, Farraia et al., 2019).

Důležitou roli zde hraje správný výběr senzorů. V biomedicině se nejvíce používají amperometrické senzory plynů (AGS), vodivých polymerů (CP), polovodičů kovů a oxidů křemíku (QMB) a povrchových akustických vln (SAW). Dále to může být výběr sensorického pole. Například sensorová pole, která jsou tvořena CP, SAW, QMB a optickými senzory, jsou dobrou volbou výběru, protože mají širokou škálu detekce pro VOC a vysokou přesnost a citlivost. Tato metoda se využívá při identifikaci rodu plísní *Fusarium*, *Aspergillus*, *Fonsecaea pedrosoi* a *Coccidioides* (Wilson a Baietto, 2011, Gongora et al., 2018, Suchorab et al., 2019).

3 Molekulárně biologické metody

Ve 21. století došlo k významným pokrokům v metodách a postupech používaných k identifikaci plísní v mikrobiologické laboratoři. Pro rostoucí počet izolátů, které jsou atypické, se v mnoha klinických laboratořích stále více používají identifikační metody založené na detekci specifických úseků DNA. Lze nalézt velké rozdíly ve složitosti testu, cílech a detekčních metodách (Balajee et al., 2007).

3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Jedná se o metodu, při níž dochází ke zmnožení (amplifikace) DNA. Amplifikovaný úsek DNA je lemován sekvencí, která je komplementární k primerům (oligonukleotidy). Primery jsou části DNA, která je složena z 15-30 nukleotidů, prostřednictvím své komplementarity se navazují na konce daného úseku. Syntéza DNA začíná probíhat od navazujících primerů, a provádí jí termostabilní DNA polymeráza (Lorenz, 2012). Pro přípravu reakce jsou nezbytné tyto komplementy, jako je templátová DNA, primery, dNTP směs, reakční pufr, Taq polymeráza, chlorid hořečnatý ($MgCl_2$) a voda. Významnou roli hraje teplota, protože její přesná hodnota je důležitá při denaturaci, nasedání primerů a při syntéze DNA. Reakce se většinou provádí ve 30 cyklech. Každý cyklus obsahuje úvodní denaturaci, denaturaci, nasedání primerů, extensi a závěrečnou extenci (Lorenz, 2012; Maheaswari et al., 2016).

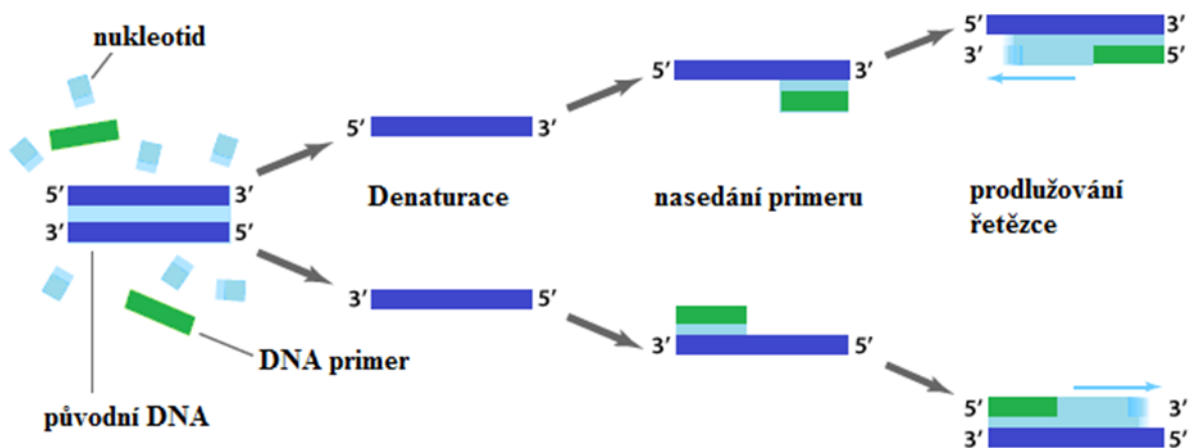
Při užití PCR pro identifikaci plísní je velkým plusem vysoká rozlišovací schopnost metody. Vhodnější je užití PCR při potvrzování druhu nebo rodu. Méně vhodné je hledat neznámý druh plísně a sekvenovat celou DNA. Například u klinických vzorků (krev), které obsahují malé množství plísňových buněk. Ty se všechny musí lyzovat, aby došlo k zisku co největšího množství DNA. Dále se používají purifikační techniky, které po extrakci DNA odstraní jiné molekuly než plísňové DNA, které by rušily reakci PCR (př. hemoglobin inhibuje Taq DNA polymerázu). Dalším z důležitých faktorů je kontaminace fungální DNA, která eliminuje široké přijetí testů založených na PCR, hlavně při použití nesterilních vzorků nebo nespecifických primerů. Existují specifické soupravy pro automatickou extrakci a čištění DNA, které se dokáží vypořádat s kontaminací DNA a poskytují reprodukovatelné výsledky. Po extrakci a vyčištění DNA následuje amplifikace určitých sekvencí. Ty jsou ohraničené primery, které identifikují plísně dle jejich druhů a kmenů.

Skupina genů ribozomální RNA (rRNA) je populárním cílem pro PCR, obsahuje 18 oblastí Svedberg (S), interní transkribovaný spacer (ITS), 5,8S, ITS2 a 28S. Po amplifikaci je na řadě detekce a kvantifikace. K analýze se může používat DNA i RNA. Jako výhodnější se jeví RNA, protože ji lze nalézt ve větším množství (Balejee et al., 2007; Kourkoumpetis et al., 2012).

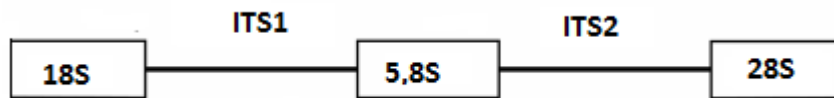
K analýze lze využít velmi malé množství vzorku. Ke zviditelnění se využívá RT-PCR (reverzní transkripce). Vybrané primery syntetizují pouze DNA cílového organismu. Pokud se o vybranou plíseň nejedná, k amplifikaci nedojde a žádný produkt nevznikne. Pro různé druhy plísní existují specifické primery. Abliz a Fukušima například vypracovali studii, kde se zabývají přípravou primerů podle interních transkribovaných spacerových oblastí ribozomální DNA plísně *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Hortaea werneckii*. Tato sada primerů obsahuje amplikon o délce 333 párů bází pro kmen *Fonsecaea*. Tento úsek DNA v jiných plísních nenajdeme. Tyto plísně jsou původci chromoblastomykózy a invazivních onemocnění, až v 90 % případů. Použití těchto primerů ještě není zavedenou praxí v běžných laboratořích. Využívá se ITS oblast mezi 18S (Svedberg) a 26S nukleárními rDNA sekvencemi, které obsahují dva spacery (ITS1 a ITS2). K mezidruhové identifikaci se používají sekvenční rozdíly v oblastech ITS1 a ITS2. U *Cladophialophora carrionii* je amplifikovaný úsek dlouhý 362 párů bází. Použitá oblast byla stejná jako u *Fonsecaea* (Balejee et al., 2007; Abliz et al., 2003; Fukushima et al., 2004).

Druhově specifické primery jsou podrobně popsány i u *Paracoccidioides brasiliensis*. Tyto primery ohraničují úsek DNA dlouhý 418 bp se 100 % úspěšností. Pro *Microsporium audouinii* jsou k dispozici mikrosatelitové sekvence od Roque a Viery (2006), kde byly navrženy primery (MA_1F) a (MA_1R), které vykazují vysokou spolehlivost v diagnostice. Zmnožený úsek byl dlouhý 431 bp a byl označen za spolehlivý, doporučuje se k použití v laboratorní analýze. Pro zygomecety, které se podílejí na řadě infekčních onemocnění u člověka, byla použita 28S ribozomální sekvence k přípravě specifické dvojice primerů. V jiné studii se Nagao zabýval sekvencí ITS u pěti druhů *Rhizopus*. Jeho výzkum vedl k vytvoření druhově specifických primerů, díky kterým lze rozlišovat jednotlivé druhy (Balejee, 2007; Imai et al., 2000; Roque a Viery, 2006).

K určení druhů nebo rodů lze použít i délku nebo také vzorce fragmentů vzniklých během procesu PCR. *Coccidioides immitis* a *C. posadasii*, které způsobují horečku Valley, jsou rozlišovány právě na základě délky amplikonu. V současnosti se používají na rozlišení těchto druhů dvě metody, a to délky mikrosatelitních lokusů nebo mononukleotidové polymorfismy v několika enzymech. Obě metody jsou finančně náročné, a proto byl navržen způsob detekce na základě délky amplikonu. K přesnému stanovení délky se používá kapilární elektroforéza (Balejee et al., 2007; Umeyama et al., 2006).



Obrázek 13 Zjednodušené schéma PCR (převzato a upraveno dle Xpresspcr, 2012)



Obrázek 14 Schéma znázorňující umístění oligonukleotidů pro amplifikaci ITS1 a ITS2 (převzato a upraveno dle Choi, 2012)

3.1.1 Metody založené na náhodně amplifikované polymorfni DNA (RAPD)

Tato metoda se využívá ke zmnožení DNA arbitrárních oligomerních nukleotidových primerů. Tyto oligonukleotidy slouží jako přímý i reverzní primer. Jsou schopné amplifikace fragmentů z 1-10 genomických míst současně. Vyskytuje se zde určité spektrum amplifikačních produktů, které se rozdělují gelovou elektroforézou. Zvláštní výhodou této metody je, že není nutná předchozí znalost genomu nebo DNA daných sekvencí. Dále není zapotřebí velkého množství templátové DNA. Primery pro analýzu jsou komerčně dostupné. Bohužel značnou nevýhodou je nízká opakovatelnost. Tato technika se používá při identifikaci dermatofytů, jako je *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus* (Olive a Bean, 1999; Sahaza et al., 2019).

3.1.2 Repetitivní PCR (rep-PCR)

Je to typizační metoda založená na opakovaných prvcích (rep-PCR) a umožňuje vytvoření otisku prstu DNA. Dochází k rozlišení plísni pomocí doplňujících primerů komplementárních k rozptýleným, stále se opakujícím se konsenzuálním sekvencím. Ty umožňují amplifikaci úseků DNA jakýchkoli velikostí, skládající se ze sekvencí mezi opakujícími se prvky. Následnou elektroforézou lze rozdělit více amplikonů s různou velikostí a porovnat konečné otisky prstů. Vyhodnocení vytvořeného vzorce DNA je analyzováno na mikrofluidním čipu v bioanalyzátoru. Tato metoda je vhodná pro identifikaci plísni rodu *Aspergillus*, *Fusarium* a dimorfních hub. Každá neznámá DNA vytváří vzor fragmentů, které jsou porovnány se vzory v knihovně známých druhů. K identifikaci se používá například systém DiversiLab nebo další systémy (Houston, Spectral Genomics), které jsou rychlé a spolehlivé. Tento systém využívá právě rep-PCR pro rod *Aspergillus*. Skládá se ze tří částí, a to z reagenční sady rep-PCR, bioanalyzátorů například Agilent, který dělí amplifikované úseky na mikrofluidním čipu a následně je detekuje podle intenzity fluorescence a doby migrace. A poslední částí je webový software. Konečná zpráva systému obsahuje dendrogram a rozptylový graf. Dendrogram zobrazuje vztah podobnosti párů mezi izoláty. A rozptylový graf ukazuje prostorový pohled na vztahy. Můžeme k nim přiřadit i gelové snímky. Tento systém je komerčně dostupný, proto se často využívá v laboratořích (Spigaglia a Mastrantonio, 2003; Pounder et al., 2005).

3.1.3 Nested PCR

Jedná se o jednu z nejcitlivějších technik PCR. Největším problémem bývá křížová kontaminace nebo kontaminace při přenosu. U Nested PCR má produkt DNA velikou specifitu například v oblasti ITS. Celý proces je složen ze dvou částí, kdy jsou použity rozdílné primery. Výsledkem první reakce PCR je tvorba amplikonů. V druhé části je s druhou sadou druhově specifických vnitřních primerů použit tento produkt jako templát a je specifický pro zamýšlený cíl pouze u sledovaného druhu. Tato metoda se používá při identifikaci dermatofytů, například *Trichophyton* a *Microsporum* (Deepachandi et al., 2019; Garg et al., 2007).

3.1.4 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Principem této metody je, že využívá restrikčních enzymů (endonukleas), které následně štěpí DNA. Mezi tyto enzymy můžeme řadit například Msp I, Hin Fi a Eco RI, které se snaží vytvořit rodový nebo druhový vzor pro identifikaci plísní. Msp I je pro tvorbu druhových specifických vzorů rodu *Cryptococcus* a *Candida*. Zatímco restrikční enzym Hin Fi je dán pro rod *Aspergillus*. A Eco RI rozlišuje druh *Candida* od *Aspergillus* a *Cryptococcus*. Po štěpení následuje vytvoření různě dlouhých pruhů a počtu fragmentů DNA, které jsou viditelné na agarózovém gelu (Velegaki et al., 1999; Wei, et al., 2008).

3.1.5 Metoda založená na PCR v reálném čase

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Real-time PCR nebo qPCR) je založena na klasické PCR metodě, liší se jen tím, že je možné sledovat probíhající amplifikovaný produkt při singulárních cyklech reakce. Používá se přístroj Light Cycler. Ke kvantifikaci PCR se používají fluorescenční barviva, která jsou přímo úměrná množství PCR produktů. Vyskytují se tu dvě možnosti detekce, a to buď nespecifická, nebo specifická detekce. Nespecifická detekce produktů se uskutečňuje pomocí fluorescenčních barviv (SYBR Green, ethidiumbromid). Specifická detekce je prováděna určitými specifickými sondami (TaqMan, FRET, Scorpions). K detekci amplifikované DNA lze využít barviva vázající DNA nebo fluorescenční sondy. První možností je SYBR Green 1. Jedná se o fluorescenční barvivo, které se váže pouze na dsDNA, neváže se tedy na jednovláčkovou DNA. Barvivo samo o sobě vykazuje velmi slabou fluorescenci, a po navázání se fluorescence rapidně zvýší. Vlastní měření se provádí po proběhnutí elongace.

Metoda je levná a jednoduchá. Míra fluorescence je poté přímo úměrná množství dsDNA. Velkým úskalím je nespecifičnost. SYBR Green 1 se totiž váže na všechny nově vzniklé dsDNA, což obnáší i falešné pozitivní výsledky. Problém s nespecifičností lze částečně vyřešit spojením s analýzou teploty tání. Při použití křivek tání a jejich porovnání lze zvýšit specifičnost reakce. Pík tání artefaktu reakce je široký a obecně se nachází v oblasti nižších teplot, než je pík tání amplikonu (Arya et al., 2005; Tajadini et al., 2014).

Hydrolytické sondy využívají startovací a zpětný primer. Pracuje se s 5'-3' nukleázovou aktivitou. Obecně nejoblíbenějším enzymem je Taq polymeráza, možno je ovšem využít jakýkoli jiný enzym, který vykazuje 5' nukleázovou aktivitu. Používá se oligonukleotidová sonda, na kterou je navázáno reportérové a zhašecí fluorescenční barvivo. Nabízí se široká škála barviv odvozených od 6- karboxylfluoresceinu.

Například tetrachlor 6- karboxylfluorescein, hexachloro-6- karboxylfluorescein nebo karboxylfluorescein samotný. Pokud je sonda kompletní, nevyzařuje se žádná fluorescence. V momentě, kdy vzniká amplifikovaný produkt Taq polymeráza rozštěpí sondu, a zvýší se fluorescence. Další možností je použití duálních hybridizačních sond. Ty nesou na svém 3' donorový a 5' konci akceptorový fluorofor. Při denaturaci obě sondy hybridizují a díky blízkosti obou barev je umožněn fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET). Dojde k přenosu energie a k rozptylu fluorescence v jiné vlnové délce. Míra fluorescence je opět přímo úměrná množství vznikajícího amplikonu. Konformace stonku a smyčky zajišťuje blízkost obou barviv, a to vede k nulové fluorescenci. V okamžiku, kdy molekula hybridizuje se specifickou sekvencí nukleové kyseliny, dojde k rozpadu sondy a vzniku fluorescence. Podobnou konfiguraci vykazují i tzv. scorpiony. Scorpion sondy jsou primery, které nesou na svém 5' konci navázanou fluorescenční sondu. Fluorescenční sonda je složena z oligonukleotidů. Která na svém jednom konci má fluorofor a na druhém nese molekulu, která pracuje jako zhášec (zabraňuje fluorescenci fluoroforu). Díky vzájemné komplementaritě konců oligonukleotidů se vytváří vlásenka. V důsledku těsné blízkosti molekuly zhášec a molekuly fluoroforu nedochází k vyzáření fluorescence. Jakmile dojde k PCR, sonda nasedá k cílové sekvenci a dojde k extenzi primeru a ke vzniku požadované sekvence. Následuje denaturace a rozpad vlásenky. Následně dochází k oddálení molekuly zhášec a molekuly fluoroforu, čímž dojde k vyzáření fluorescence (Arya et al., 2005; Thelwell et al., 2000).

Na rozdíl od použití Taq polymerázy nebo molekulárních majáků se zde jedná o intramolekulární reakci a díky tomu je reakce rychlá a fluorescence mnohem intenzivnější. Tento PCR systém je vhodný pro identifikaci různých druhů plísní. Nejčastěji to jsou *Aspergillus fumigatus* a *Candida albicans*. Dále to mohou být dermatofyty (Arya et al., 2005; Valero et al., 2016).

3.2 Gen Probe Accuprobe test

Tato metoda je komerčně dostupná pro identifikaci plísní a nevyžaduje polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Test lze použít k potvrzení izolátů *Histoplasma capsulatum*, druhů *Coccidioides* nebo *Blastomyces dermatitidis*. Metoda používá jednovláčkovou DNA sondu s chemiluminiscenčním značením, která ve vzorku hybridizuje s ribozomální RNA. Vyžadovány jsou aktivně rostoucí kultury (nesmí být starší než 4 týdny), izoláty mohou být odebrány z pevných médií nebo z kultivačního média.

Po uvolnění ribozomální RNA z organismu se značená sonda DNA kombinuje s ribozomální RNA cílového organismu a vytvoří stabilní hybrid DNA-RNA. Selektivní činidlo umožňuje diferenciaci nehybridizované a hybridizované sondy. Značené hybridy DNA-RNA se měří v relativních světelných jednotkách (RLU) pomocí luminometru. Extrakty, které zobrazují hodnoty RLU větší než 50 000, se považují za pozitivní. V porovnání s ostatními metodami se tento komerční test pro rutinní provoz v laboratořích nepoužívá. K výhodám tohoto testu patří vysoká citlivost a specifčnost, rychlé provedení a ekonomická dostupnost. Test často poskytuje falešně pozitivní výsledky (Azar a Hage, 2017; Balajee et al., 2007; Wickes a Wiederhold, 2018).

3.3 Metody založené na hybridizaci nukleových kyselin

V klinických laboratořích se využívá technika Hybridizace in situ (ISH). Cílem hybridizace in situ je určit přítomnost nebo nepřítomnost požadovaných sekvencí DNA, popřípadě RNA a také lokalizovat tyto sekvence do specifických buněk nebo chromozomálních míst. Je to technika, která se používá k zjišťování určitých sekvencí DNA a RNA v buňkách, tkáních a chromozomech. Principem této metody je, že dochází ke komplementárnímu párování značených sond DNA nebo RNA se sekvencemi nukleových kyselin (NK) v buňkách, tkání a chromozomech, které jsou fixovány na mikroskopickém sklíčku. Nejprve je nutná denaturace dvouvláknové DNA. Poté dojde k navázání značené sondy a renaturaci. Byla-li přítomna požadovaná sekvence DNA je zaznamenán signál. Tato metoda ISH se používá pro identifikaci plísní například z krevních kultur (rod *Candida*) a v histologických preparátech. Pro hybridizaci in situ se používá mnoho sond, například cDNA, cRNA a syntetické oligonukleotidové sondy. Nejčastěji se používají dvě oligonukleotidové sondy. Jako první typ sondy je myšlen samotný úsek DNA, který je komplementární k dané sekvenci. Tyto sondy rozlišujeme podle typu značení sond, a to buď na radioaktivní nebo sondy značené fluorescenčně nebo pomocí antigenu značeným bázemi. Sondy značené radioizotopem jsou sledovány autoradiografií s rentgenovým filtrem. Plusem tohoto typu značení je vysoká citlivost. Použití radioaktivity ovšem přináší i problém s likvidací radioaktivního odpadu, dlouhou dobu expozice a špatným prostorovým rozlišením. Pro neradioaktivní značení jsou používány sloučeniny, jako jsou biotin, fluorescein, digoxigenin, alkalická fosfatáza, nebo bromodeoxyuridin a jsou zvýrazněny pomocí histochemie nebo imunohistochemie (Jensen, 2014; Carter et al., 2010). Druhý typ jsou peptidové sondy nukleových kyselin (PNA). Tyto peptidové nukleové kyseliny se v přírodě nevyskytují, musí se vyrobit, jsou tedy syntetické. Hlavním rozdílem mezi DNA a PNA je v hlavní části molekuly, protože PNA neobsahuje žádné cukernaté a fosfátové části na rozdíl od DNA. Dalším rozdílem je, že každá má jiný náboj. DNA cukr-fosfátová kostra má záporný náboj a PNA neutrální náboj. Společné mají čtyři nukleové báze (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin), které se párují pomocí Watsonových a Crickových bází. Tyto vlastnosti jsou tak vhodné pro vytvoření ideální sondy. K metodě zesílení signálu se používá Chemiluminiscenční hybridizační technologie rRNA sond od firmy GenProbe. Tato metoda používá sondy, které míří na rRNA. Ta se vyskytuje v hojném počtu kopií v každé buňce. Následně je sonda objevenována díky vlastní chemické reakci, kde dochází k tvorbě světla.

Chemiluminiscenční hybridizační technologie je využívána v laboratořích pro identifikaci dimorfních hub. Mezi hybridizaci in situ se řadí Fluorescenční hybridizace in situ (FISH) a Chromogenní hybridizace in situ (CISH). Chromogenní hybridizace se používá při identifikaci různých druhů rakovinotvorných buněk. Mezi další metodu pro identifikaci plísni se může použít kombinace hybridizace in situ a průtokové cytometrie. Hlavní výhodou této metody je, že dokáže pracovat s velmi malým množstvím vzorku, na kterém lze provádět mnoho hybridizací (Prudent a Raoult, 2019; Procop, 2007).

3.3.1 Metoda Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Tato metoda patří mezi techniky přímé analýzy DNA, které využívají fluorochrom. Principem je přímá vazba (hybridizace) mezi denaturovanou fluorescenční sondou a doplňujícími cílovými RNA nebo DNA sekvencemi. Následně dochází k lokalizaci signálu díky fluorescenční mikroskopii. Tato technika se aplikuje kvůli detekci a lokalizaci nukleotidových sekvencí v rozdílných vzorcích, které zachovávají celistvost buněk. Tato metoda provedení zahrnuje čtyři kroky. Prvním krokem je fixace vzorku (buňka nebo tkáň). U druhého kroku je nutná úprava vzorku před vstupem sond k nukleovým kyselinám. Následuje přímá vazba daných sond k DNA nebo RNA. A poslední krok zahrnuje promytí sond a provedení vizualizace pomocí mikroskopii nebo průtokovou cytometrií. Důležitou součástí jsou zde sondy. Fluorescenční sonda je složena ze dvou částí. První část obsahuje nukleové sekvence, které jsou komplementární k cílové sekvenci, která má být rozpoznána. Druhou částí je fluorescenční marker, ten způsobuje provedení hybridizace. Jak už je známo, používají se dva typy sond. A to buď klasické oligonukleotidové sondy, nebo PNA sonda. U klasických oligonukleotidových sond záleží na výběru daného místa a sekvenci sondy. Důležitou roli hraje délka sekvence, v případě velmi krátké sekvence by se vyskytovala ve větším počtu biologických cílů. A naopak, pokud by byla dlouhá, tak selektivita vzhledem k cíli klesá. Krátké sondy jsou výhodnější, protože mají lehčí přístup k danému cíli. Tyto sondy mají délku 15-30 bází, jsou kovalentní a spojené s jediným fluorescenčním barvivem. U FISH se PNA dokáže navázat na DNA nebo RNA, i za podmínek nízkého obsahu soli. V porovnání s klasickými oligonukleotidy je rychlost hybridizace PNA zvýšená 48 000krát, pouze pokud splňuje podmínku nízké iontové síly. Dále má PNA vysokou afinitu k RNA. Bohužel, PNA sondy jsou dražší než klasické oligonukleotidové sondy.

K označení FISH sond se používají fluorescenční barviva. Pro plísně to je fluorescenční barvivo 4,6- diamidino-2-fenylidol dihydrochlorid (DAPI), který vykazuje modrou fluorescenci. Dále to je fluorochromové barvivo Cy3 (zelená), které je založeno na cyaninových barvivech. FISH je výjimečná technika, protože dokáže kombinovat molekulárně biologické a histochemické techniky (Prudent a Raoult, 2019; Rickerts et al., 2011).

U plísní se používají oba typy sond. Přitom se spíše používá sonda PNA, která má silnější vazbu a účinnější reakci, díky nenabitému hlavnímu řetězci, který je neutrální. Tento test je rychlý, citlivý, není potřeba provést kultivaci, je snadný na přípravu a může se provést i na vzorcích jako je krev a mozkomíšní mok. Nevýhodou je nízká intenzita signálu a ekonomické pořízení dražší PNA sondy. Metodou PNA-FISH lze identifikovat rod *Candida*, *Aspergillus*, *fumigatus* (Wickes a Wiederhold, 2018; Zwirgmaier, 2005).

3.3.2 Metody založené na mikročipu

DNA mikročip se skládá z oligonukleotidů, které jsou navázané na pevný povrch (sklíčko). Mezi nejvíce používané instrumentace měření patří komplementární DNA microarrays. Principem je hybridizační reakce daného vzorku DNA se sekvenčně specifickými DNA sondami, které jsou umístěny na mikročipu. Na mikročipu mohou být zafixované i tisíce sond. Díky tomu lze současně analyzovat neznámou DNA s velkým počtem taxonů. Proces se skládá z několika kroků. Prvním krokem je oddělení a amplifikace DNA nebo RNA. Druhým krokem je dělení a fluorescenční označení daného amplifikovaného cíle. Následně dojde k hybridizaci s čipem, kde se daný vzorek naváže na DNA sondu. A v posledním kroku dojde ke snímání čipu a ke změření intenzity fluorescence pro každý samostatný prvek. Tyto cílové úseky DNA se identifikují dle průchodu fluorescenční emise laserovým paprskem. Výsledkem je stanovení pozitivních nebo negativních skvrn. U této metody se používá mRNA jako náhradní marker. Bohužel se snadno znehodnocuje jeho funkce, a proto musí být převeden na jinou formu cDNA (Jakubek a Cutler, 2012; Govindarajan et al., 2012).

Pomocí fluorochromových barviv jako je Cy3 (zelená) a Cy5 (červená) se značí cDNA. U neznámých molekul DNA dochází ke štěpení pomocí restričních endonukleáz na úseky DNA. Tato metoda je rychlá, specifická a citlivá (Govindarajan et al., 2012). Dokáže identifikovat druhy plísní například *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Sporothrix* a dermatofyty (Balejee et al., 2007).

3.3.3 Technologie Luminex

Luminex xMAP je mikrosférový multiplexovací systém. Metoda je založena na principu vazby sondy a templátu. Tato technika využívá různorodé faktory mikrosfér v kapalném poli jako určující parametry analytu. Mikrosféry jsou malé kuličky, které jsou vnitřně barveny různými fluorofory. Dle různé koncentrace fluoroforů se vytváří sady mikrosfér. Každá ojedinělá mikrosféra má svou spektrální značku. Na povrchu jakékoliv mikrosféry dochází ke snadné chemické reakci, která umožní spojení různých činidel, které jsou specifické pro daný test. Jako například testy nukleových kyselin. Fluorescenční reportér například Streptavidin nebo Cy3 nasedá na specifickou molekulu, což vede k navázání na stěnu mikrosféry a následnou detekci. Mikrosféry se dělí podle struktury, a to buď na nemagnetické (základní), nebo magnetické. Nemagnetické mikrosféry se skládají z 5,6 μm polystyrénových kuliček, které jsou pokryty na povrchu karboxylovými skupinami (cca 180 skupin). Naopak magnetické mikrosféry mají odlišnou strukturu a velikost (6,5 μm) v důsledku přidání magnetické vrstvy. Mezi finančně dostupné mikrosféry můžeme jmenovat například typ mikrosfér MicroPlex, MagPlex a LumAvidin. K analýze se používají dva lasery. Buď červený klasifikační laser (635 nm), který emituje fluorescenční barviva mikrosfér, a tím identifikuje danou sadu mikrokuliček, dle jejího spektra. Druhým laserem je zelený reportérový laser (525–532 nm), který umožňuje navázání fluorescenčního reportéra na daný analyt na povrchu mikrokuliček. Reportér je gen, který se připojuje k sekvenci plísň. V momentě, kdy se tento gen začne exprimovat, získáváme snadno měřitelnou charakteristiku, jako je fluorescence (Reslova et al., 2017; Martin et al., 2019). Následně jsou zde detekční přístroje. Jako hlavním detekčním nástrojem je MAGPIX. Ten reaguje pouze s magnetickými mikrokuličkami (MagPlex). Principem detekce MAGPIX je znehybnění mikrosfér v jedné vrstvě na magnetickém povrchu. Výhoda tohoto přístroje je ta, že detekuje všechny mikrokuličky zároveň, a přitom generuje data, která lze porovnat s jinými metodami. Další detekční přístroje jako je Luminex 100/200 a FlexMAP 3D mají princip založen na průtokovém cytometru. Zde dochází k zaostření mikrokuliček s analytem pod rychle tekoucím proudem tekutin. Následuje detekce a digitální vyhotovení mikrokuliček, poté co prošel proud kyvetou. U MAGPIX se používají 96- jamkové destičky a u Luminex nebo FlexMAP 3D až 384- jamkové destičky. U plísň se zde používá přímá hybridizace DNA (DDH). Zde dochází k amplifikaci dané sekvence DNA a mezitím je jeden z primerů fluorescenčně označen.

Následuje hybridizace amplikonů, aby došlo k zachycení oligonukleotidů na povrchu mikrosféry. Tato metoda má široké spektrum detekce pro identifikaci plísní, ale lze ji použít i pro genotypizaci plísní. DDH umožňuje rychlou a přesně danou identifikaci plísní. Mohou se zde zařadit druhy plísní, jako jsou například *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Mucor* a *Rhizopus* (Reslova et al., 2017).

3.4 Metody založené na sekvenování DNA

Tato metoda se používá k určení pořadí (sekvence) nukleotidových bází v molekule DNA. Metody dělíme na tradiční a na metody sekvenování nové generace (Kolísko, 2017). Do tradičních metod patří Maxam-Gilbertova metoda a Sangerova metoda. Stále mají řadu výhod, například dokáží sekvenovat velkou část délky daných úseků DNA a umožňují vysokou přesnost sekvenování s minimální chybou. Naopak, nevýhody těchto metod jsou vysoká cena a nízká rychlost. Následují metody nové (druhé a třetí) generace. K druhé generaci (NGS) patří 454, Ion Torrent, Illumina a SOLiD sekvenování. U těchto metod druhé generace sekvenování (NGS), je základní princip stejný, nejdříve dojde k amplifikaci úseků DNA pomocí PCR, a pak následuje paralelizace procesu sekvenování. Konečně do třetí generace patří Single Molecule Real-Time sekvenování (SMRT) a sekvenování nanopórem (Kolísko, 2017; Heather a Chain, 2016). U plísní je sekvenace poměrně oblíbenou technikou pro jejich identifikaci. Existují databáze jako je například GenBank, kde je uloženo více než 35 000 sekvencí DNA různých druhů plísní. To je ovšem jen nepatrný zlomek z celkově odhadovaných 2,2 až 3,8 milionu druhů. Samotné sekvenování využívá oblast ITS1 a 28S. Jedná se o vysoce variabilní nekódující oblasti ITS1 a ITS2 oddělené kódovacím genem 5,8S a umístěné mezi geny kódující 18S (malá podjednotka) a 28S (velká podjednotka). Na druhé straně vysoce konzervované geny 18S, 5,8S a 28S umožnily vývoj univerzálních primerů pro PCR amplifikaci a sekvenování buď celé oblasti ITS nebo oblastí ITS1 a ITS2. Genom plísní obsahuje několik repetitivních shluků ribozomální RNA, kde se nachází i ITS. Díky této skutečnosti lze amplifikovat tuto oblast i z malého množství DNA. Sekvenování je hojně využíváno ve výzkumných ústavech a referenčních pracovištích. Masové použití v běžných klinických laboratořích komplikují vysoké náklady a přítomnost odborného personálu. V mnoha případech nemusí být oblast ITS dostatečně citlivá, aby došlo k rozlišení mezi některými houbami na úrovni druhu, což vyžaduje použití jiných lokusů

Rychle se rozvíjející alternativou k sekvenování rDNA je sekvenování celého genomu (WGS). Tato metoda se v běžné praxi příliš nepoužívá. Stále je příliš nákladná, komplikovaná a příliš pomalá pro běžné použití ve většině klinických mikrobiologických laboratořích. Důležitým faktorem je velikost genomu, která je v houbách nesmírně variabilní nebo dynamika genomu plísni. Na druhou stranu při WGS se získávají epidemiologické údaje každého kmene a možné rezistence k léčivům (Forion et al., 2018; Wickes a Wiederhold, 2018).

3.4.1 Maxam-Gilbertovo a Sangerovo sekvenování

Tyto dva způsoby sekvenování se řadí k metodám první generace. Principem Maxam-Gilbertovy metody je, že dochází k chemickému štěpení individuálních typů bází. V současnosti se tato metoda nepoužívá. Naopak, Sangerovo sekvenování se používá stále. Patří k velmi starým sekvenačním technikám. I přes svoji letitost umožňuje tato technika číst velmi dlouhé řetězce. V průběhu metody dochází k neustálému opakování syntézy DNA podle jednoho templátu. Ovšem při každé nové syntéze dojde k navázání modifikované nukleotidové báze (tzv. dideoxynukleotidu). Modifikace spočívá v nepřítomnosti OH skupiny. DNA polymeráza tak nemůže pokračovat v syntéze a ta je zastavena. Takto upravená báze na sobě navíc nese fluorescenční barvu. Každá báze ddATP, ddCTP, ddGTP nebo ddTTP v závislosti, zda se jedná o adenin, cytosin, guanin nebo thymin, má svoji vlastní fluorescenční barvu. Náhodným přerušováním vznikají tedy různě dlouhé produkty. Po proběhnutí dostatečného množství opakování získáme směsici různě dlouhých produktů, které odpovídají všem potenciálním možnostem navázání této pozměněné báze.

Výsledkem je získání různě dlouhých produktů, které mají na svém konci navázanou fluorescenčně značenou bázi. Díky fluorescenci lze zjistit o jaký nukleotid se jedná. Po seřazení produktů od nejkratšího po nejdelší, lze lehce přečíst, o jakou sekvenci se jedná.

Hlavní výhodou Sangerovy techniky sekvenování je schopnost číst velmi dlouhé úseky DNA pomocí jedné reakce (až 1000 bází), malá chybovost a vysoká přesnost. Jako slabou stránku lze označit vysokou cenu a pomalou rychlost metody. Dalším problémem je, že při metodě dochází k sekvenaci pouze jednoho úseku DNA (Heather a Chain, 2016; Totomoch-Serra et al., 2017; Kolísko, 2017).

3.4.2 454 sekvenování

Jedná se o techniku sekvenování, která se řadí k metodám druhé generace. Objevena byla až v roce 2005. Používání 454 sekvenování znamenalo velkou revoluci. Technika dokáže analyzovat až milion molekul DNA najednou. Délky sekvencí, se kterými se pracuje, dosahují 700 až 1000 bází. Vlastní proces spočívá v přichycení DNA na kuličku, na které dochází k neustálému pomnožování DNA, až dojde k celému pokrytí této kuličky. Následně je kulička vložena do jedné z mnoha jamek na destičce, na které probíhá vlastní reakce na principu pyrosekvenování. Tak se označuje proces, kdy se při vkládání nové báze do vznikajícího řetězce uvolňuje molekula pyrofosfátu. Ten se poté účastní kaskády enzymatických reakcí. Finálním krokem je vznik luciferázy, který vydá charakteristický záblesk, jenž je snímán detektorem. Vždy když se přidá, jedna báze se naváže podle pravidla komplementarity ke svému partnerovi a dojde k záblesku. Pokud dochází k navázání více stejných bází za sebou, je světelný signál intenzivnější. Za dvě stejné báze je signál 2x silnější. Vždy je přidáván pouze jeden typ nukleotidu (A, T, G nebo C), monitorována je celá destička a podle toho, která komůrka se rozsvítí, se zjišťuje, o jakou bázi šlo. Mezi kroky přidávání bází je zařazen proces odstranění přebytečných nukleotidů a tím je zajištěna přítomnost vždy jen jedné báze. Počítač následně dle světelných signálů určí, o jakou jde sekvenci (Kolísko, 2017; Heather a Chain, 2016; Wicker et al., 2006).

Mimo pyrosekvenování lze použít metodu Ion Torrent, kdy dochází k měření pH ve směsi. Hodnota pH se podobně jako světelný signál mění na počtu přidaných nukleotidů.

Obě tyto metody 454 sekvenování mají problém se čtením dlouhých homopolymerních řetězců. Tedy řetězců složených pouze z jednoho typu nukleotidů. Jak pyrosekvenování, tak ani Ion Torrent metoda není schopna v tomto případě určit, zda došlo k navázání 9, 10 nebo více nukleotidů. Dochází tak ke vzniku chyby, kdy báze chybí nebo naopak přebývá. Metoda je ovšem finančně dostupná a snadno prakticky uskutečnitelná (Kolísko, 2017; Wicker et al., 2006).

3.4.3 Illumina sekvenování

Illumina je v současné době nejvíce používanou metodou sekvenování. Najednou dokáže sekvenovat vysoké počty bází, až 900 miliard. Na druhou stranu dokáže zkoumat sekvence dlouhé jen několik stovek bází. Při zahájení sekvenování jsou molekuly DNA přichyceny k destičce a několikrát se namnoží. Princip je velmi podobný Sangerově metodě. Postupně jsou navazovány fluorescenčně označené báze, které ukončí syntézu. Ovšem na rozdíl od Sangerovi metody je toto navázání vratné. Po detekci fluorescence dojde k enzymatickému odstranění fluorescenční a blokuující části na bázi. Syntéza poté může pokračovat dále. Počítač analyzuje záznam a podle toho, jak se mění fluorescenční signál v rámci každé skupiny (skládající se z identických molekul DNA), zrekonstruuje přesnou sekvenci molekul DNA. Illumina má velmi vysokou přesnost čtení DNA (99 až 99,9 %). Nejčastější chybou je špatně přečtená báze, záměna jednoho nukleotidu (Kolísko, 2017; Heather a Chain, 2016; Reuter et al., 2015).

3.4.4 SOLiD

Na rozdíl od svých předchůdců využívá tato metoda místo DNA polymerázy enzym ligázy. Ta je schopna připojovat celé úseky jednořetězcových DNA. Ty se označují jako sondy, které začínají všemi možnými dvojkombinacemi čtyř základních nukleotidů, tedy 16 možných variací sond, které jsou fluorescenčně značené. V každém kroku pak enzym ligáza připojí k rostoucímu novému řetězci sondu, nesoucí dvojkombinaci nukleotidů a odpovídající templátové DNA. Snímač přečte její fluorescenční značení, které je poté odstraněno a může se připojit další sonda. Templátová molekula musí být čtena opakovaně. Čtecí rámec se vždy posouvá o jeden nukleotid. Ze společné kombinace znalosti sekvence adaptéru, kterým sekvenovaná DNA začíná, a výsledného signálu čtyř fluorescenčních barev v jednotlivých čteních, se zjistí výsledná DNA sekvence (Kolísko, 2017; Heather a Chain, 2016; Garrido-Cardenas et al., 2017).

Problém nastává při přítomnosti palindromatických úseků, tedy částí, kde jsou shodné sekvence u obou komplementárních řetězců. V tomto případě může dojít k vytvoření smyčky v templátu a sonda se nemůže navázat. Obecně se tato metoda v praxi příliš nevyužívá (Heather a Chain, 2016).

3.4.5 Metody třetí generace

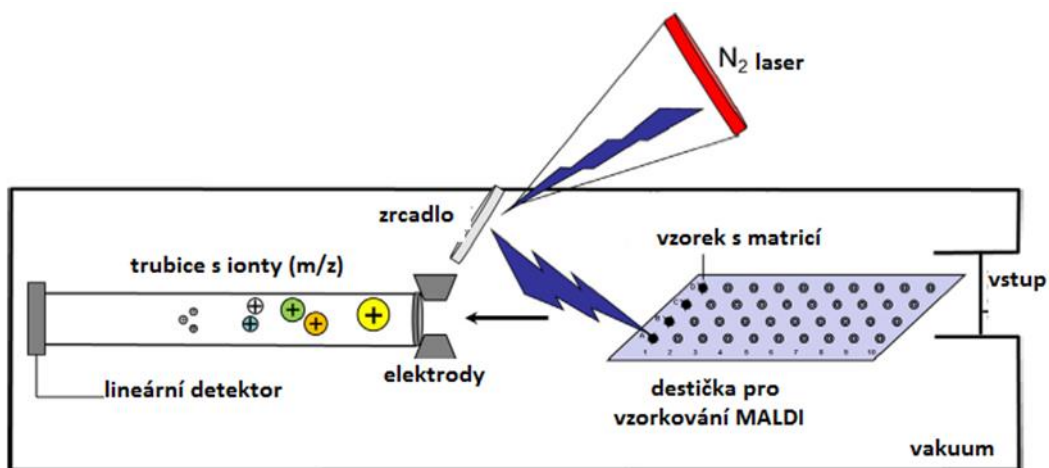
Jsou to nejmodernější techniky, kdy nedochází na počátku procesu k namnožení DNA. Čtení je proto prováděno přímo z původní molekuly. Metody třetí generace ještě nejsou masově rozšířeny, především kvůli své vysoké chybovosti (okolo 10 až 15 %), ale dá se očekávat, že v budoucnu budou hrát důležitou roli v sekvenování. Dokáží přečíst 10 tisíc i více bází v rámci jedné analyzované molekuly DNA a produkují tak velmi dlouhé sekvence, což je výhodné zejména pro sekvenování genomů (Kolísko, 2017; Ardui et al., 2018).

Existují dvě použitelné techniky. První metodou druhé generace je jednořetězcové sekvenování v reálném čase (SMRT) společnosti Pacific Biosciences (PacBio) a druhou nanoporální sekvenování technologií Oxford Nanopore Technologies. První z výše zmíněných technik využívá podobně jako u druhé generace fluorescenčně značené nukleotidy. Sekvenování začíná přípravou knihovny z dvouřetězcové DNA, na kterou jsou navázány vlásenky. Tato knihovna je poté načtena do buňky SMRT tvořené pozorovací komorou ve velikosti nanometrů (ZMWs). Molekuly DNA budou v knihovně nataženy na dno ZMW, kde polymeráza začne připojovat fluorescenčně značené nukleotidy. Fluorescence emitovaná nukleotidy je zaznamenávána kamerou v reálném čase. Lze tedy registrovat nejen fluorescenční barvu, ale také čas mezi začleněním nukleotidů, který se nazývá doba interpulze (IPD). Když se sekvenční polymeráza setká s nukleotidy na řetězci DNA obsahujícími (epigenetickou) modifikaci, jako je například modifikace 6-methyl, bude IPD zpožděno ve srovnání s nemetylovanou DNA (Ardui et al., 2018; Heather a Chain, 2016).

Druhý způsob sekvenování třetí generace využívá průchodu molekuly DNA mikroskopickým pórem na syntetické membráně. Protože každá DNA báze má trochu jiný tvar, dochází při protahování k různému zaplnění póru a citlivé detektory dokáží zjistit, jak výrazně je pór v danou chvíli zaplněn, a tedy jaká báze v daný okamžik membránou prochází. Výhodou je velmi malá velikost přístroje, který lze připojit k PC skrz USB a použít v terénu (Heather a Chain, 2016).

3.5 Metoda MALDI-TOF MS

V posledních letech se tato metoda hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) začala častěji používat v diagnostických laboratořích. Obecně vzato je to metoda, která stanovuje hmotnost atomů a molekul, které jsou převedeny na ionty do prostředí vakua. Principem je, že se vzniklý supernatant umístí na cílovou destičku MALDI (terčik), a po zaschnutí se nanese matrice, například kyselina α -kyano-4-hydroxycinnamová (CHCA). Když vzorek úplně uschne, vloží se cílová destička do ionizačního prostoru hmotnostního spektrometru. Následuje zasažení cílové destičky N_2 laserem, kde dochází k desorpci molekul (matricové a mikrobiální) a absorpci skoro veškeré energie matricí. Ta jí pak převede do ionizovaného stavu. Ionty analyzované látky jsou urychlovány a vstupují do vakua. Urychlování je dáno poměrem hmotnosti a náboje. V poslední řadě dojde k měření doby letu částice (detektor TOF, (analyzátor doby letu) a vypočte se rychlost částice jako poměr molekulové hmotnosti a náboje částice. Výsledky jsou pak vyhodnocovány v databázích (Patel, 2015; Walková et al., 2019).



Obrázek 15 Schéma principu MALDI-TOF MS (převzato a upraveno dle Lima, 2017)

U kvasinek je způsob provedení jednodušší, zde stačí pouze umístit odebranou kolonii na terčík a po uschnutí nanést matrici. Dále se může přidat roztok kyseliny mravenčí, ten se přidává kvůli zlepšení kvality generovaného spektra. U plísní je způsob provedení složitější, a to kvůli kultivaci a úpravě vzorků. U kultivace musí dojít k odebrání části mycelia z pevného kultivačního média, které je přeočkováno do tekutého kultivačního média. Následně dochází ke kultivaci, dokud není viditelné mycelium (tvar vločky). Pak dochází k technickým úpravám vzorku, jako je například centrifugace, vortexování, promytí a odstranění supernatantu. Ve vzorku zůstává pouze peleta, která musí také projít úpravou (přidání deionizované vody a ethanolu) a znovu technickou úpravou a sušením. Poté se k peletě přidává 70 % kyselina mravenčí a acetonitril. Množství kyseliny mravenčí a acetonitrilu se dává vždy stejné, záleží na velikosti pelety. Znovu dochází k technickým úpravám. Z takto vzniklé směsi se odebírá 1 μ l supernatantu, který se nanáší na MALDI terčík (Walková et al., 2019). Matrice je malá molekula organické kyseliny, která je nezbytnou součástí celé analýzy. Správně zvolený výběr matrice je důležitý, protože zabraňuje rozpadu analytu vzorku. Nejčastěji používané matrice mohou být například kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB), kyselina α -kyano-4-hydroxycinnamová (CHCA) a kyselina 3,5-dimetoxy-4-hydroxyskořicová čili sinapinová (SA). Matrice se rozpouští v acetonitrilu a kyselině trifluoroctové. Složení matric zaleží na biomolekulách a typu použitého laseru (Croxato et al., 2012). Nejčastější technikou ionizace analyzovaného vzorku je použití matrice. Jsou i jiné techniky ionizace vzorku. Mohou to být například chemická ionizace (CI), desorpce plazmou (DP), desorpce laserem (LD), desorpce a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI). Další součástí spektrometru jsou systém vakua, reflektor, laserový zdroj, detektor a analyzátor TOF. Detektorem pro hmotnostní spektrometrii s TOF analyzátozem se používá Mikrokanálové detektorové desky (MCP) čili Mikrochannel plate detektor (Croxato et al., 2012; Liu et al., 2014). Pro identifikaci plísní jsou u MALDI-TOF MS dány dvě aplikované metody. U první metody dochází k porovnání hmotnostního spektra s databází otisků prstů. U této metody se generují speciální spektra nepoškozených buněk, které se porovnávají s předchozími knihovny otisků prstů, které jsou komerčně dostupné. Při druhé metodě dochází ke spojení biomarkerů s neznámým mikroorganismem. Ten je následně přiřazen do databáze proteomu (porovnává se molekulární hmota proteinů ve spektru a molekulové hmotnosti proteinů ze sekvenovaných genomů). První metoda je lepší, protože je rychlejší a lehce přizpůsobitelná pro snadné použití v laboratořích.

Při analýze se používají různé databáze a systémy, podle kterých se vyhodnocuje shoda různých rodů plísní. Známé systémy Andromas, Bruker Biotyper a Vitek MS. Vyhodnocení záleží na výši skóre, dle něj se určuje míra pravděpodobnosti přítomnosti plísně. Například systém Biotyper 3.0 používá rozmezí skóre od 0 do 3000, a to dle přítomnosti nebo nepřítomnosti píků v záznamech databáze. Rozmezí skóre $\geq 1,7$ je označeno za nespolehlivou identifikaci, při skóre ≥ 2 se jedná o pravděpodobnou identifikaci rodu a skóre $\geq 2,3$ označuje identifikace rodu s pravděpodobnou jistotou a skóre od 2,3 do 3 je identifikace s vysokou pravděpodobností. Tato metoda se používá pro identifikaci plísní *Aspergillus*, *Fusarium* a dermatofyty. Častěji také používá MALDI-TOF MS pro identifikaci kvasinek (Croxato et al., 2012; Patel, 2015; Sanguinetti a Posteraro, 2017).

3.5.1 Metoda založena na elektrosprejové ionizační hmotnostní spektrometrii

Pro detekci plísní lze využít spojení PCR s elektrosprejovou ionizační hmotnostní spektrometrií. Výsledky jsou k dispozici za 12 až 16 h ve srovnání s 24 až 48 h pro standardní zpracování a kultivaci tkáně. Dalším velkým plusem je možnost detekovat více než jeden organismus současně ve vzorku. ESI-MS bývá také citlivější než jiné molekulární metody. Ionizace elektrosprejem se řadí k měkkým ionizačním technikám, z toho vyplývá, že je to šetrná metoda, kdy nepozorujeme fragmentované ionty. Umožňuje ionizovat molekuly s obrovskou molekulovou hmotností. Samotný proces lze rozdělit na tři kroky. Zmlžení vzorku na malé elektricky nabitě kapičky, uvolnění iontů z kapiček a konečně transport iontů do vakua a pak do analyzátoru. Vzorek je přiváděn kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Dojde k rozprášení vzniklých kapiček pomocí zmlžujícího plynu. Takto vzniklé kapičky nesou na svém povrchu velké množství nábojů. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zvyšování hustoty náboje. Po dosažení kritické hranice dojde ke Coulombické explozi. Jedná se o rozpad na ještě menší kapičky, které si rozdělí původní náboj. Proces se neustále opakuje do okamžiku vzniku iontů, které jsou unášeny do analyzátoru. Tato metoda je vhodná pro identifikaci plísní rodu *Mucor* a *Aspergillus* (Brinkman et al., 2013; Simmer et al., 2013; Shin et al., 2013; Krifors et al., 2019).

3.6 Test T2 pro magnetickou rezonanci (T2MR)

Tento test patří mezi molekulární metody, ale v praxi se často nepoužívá. Je založen na magnetické rezonanci a může se kombinovat s PCR. Obecným principem je, že měří molekuly vody, jak reagují v přítomnosti magnetických polí. Test je schopen označovat různé molekulární nebo imunologické cíle. Příkladem může být DNA nebo proteiny. U těchto dvou daných cílů používá T2 test způsob přímé detekce vzorků, a to použitím superparamagnetických částic, které dovolují signálům T2MR citlivost na dané cíle. Následuje potažení částic danými cílovými vazebnými činidly, které se pak vloží do roztoku, kde následně dojde k navázání částic a shlukování okolo daného cíle. V důsledku shlukování dochází ke změně mikroskopického prostředí vody ve vzorku. Díky změně prostředí vody se změní signál T2MR ve vzorku. Když dochází ke změně signálu, ukazuje to přítomnost daného cíle. Výhodou tohoto testu je rychlost, přesná detekce molekulárních cílů v daném vzorku bez pracného čištění a extrakce daných molekul ve vzorku. U PCR dochází ke smíchání magnetických nanočástic s ITS2 ampliconem (Pfaller et al., 2015; Wickes a Wiederhold, 2018).

Tento test se zatím provádí pouze u rodu kvasinek *Candida*, a to z plné krve. Pro detekci kandidóz se používá panel T2Candida, který je založen plně na mechanizaci přístroje T2Dx. Ten umožňuje citlivou a specifickou detekci pro rod *Candida* v plné krvi, bez předchozí nutnosti úprav, jako jsou kultivace nebo extrakce nukleových kyselin (Pfaller et al., 2015). U T2MR zatím nebyly použity jiné biologické materiály (stěry z kůže). Nejspíše proto, že vzorky kůže jsou rozmanitější ke specifickým změnám mikrobiální flóry. Po aplikaci PCR s ampliconem je možné díky jeho umístění a povaze v budoucnu identifikovat tímto testem i další rody plísní. Jak už bylo zmíněno výše, tento test se ale provádí pouze u kvasinek rodu *Candida*. Pro další možnou identifikaci kvasinek a plísní je nutná další studie (Sexton et al., 2018; Wickes a Wiederhold, 2018).

4 Patogenita plísní

V posledních letech se četnost závažných fungálních onemocnění zvýšila. V důsledku klinického použití antibakteriálních léčiv, imunosupresivních látek po transplantaci orgánů jsou spojeny se zvyšujícím se rizikem plísňových infekcí. Oportunní patogeny z rodu *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* jsou nejčastější, které napadají lidský organismus a mohou vést k infekcím sliznic a kůže nebo k tvorbě mykóz.

V současné době existují některá účinná antimykotika, ale bohužel některé patogenní druhy vykazují rostoucí rezistenci. Identifikace fungálních virulencních faktorů a rozpoznání mechanismů patogeneze může vést k vývoji nových účinných antimykotik (Karkowska-Kuleta et al., 2009). Mezi faktory rozšiřování plísní se mohou řadit léky, které podporují růst plísní a dochází k oslabení a potlačení fungování imunitního systému (některé druhy antibiotik, kortikoidy, opium) a nadměrná míra konzumace průmyslově zpracovaných potravin (Ayatollahi-Mousavi et al., 2016; Laich et al., 2002; Weinhold 2007).

Mykózy dělíme dle lokace na lidském těle. Patří sem povrchové mykózy, ty zahrnují i kožní mykózy. Do této skupiny řadíme dermatofyty, například rod *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*. Dále to jsou podkožní mykózy, příkladem může být *Sporothrix schenckii* nebo *Fonsecae pedrosi*. A poslední a nejvýznamnější skupinou jsou systémové mykózy. Zde se nachází *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* a rod *Aspergillus* (Rouzaud et al., 2015; Verma et al., 2018; Colombo et al., 2011).

5 Závěr

Práce se zabývá obecnou charakteristikou plísní a přehledem metod použitelných pro jejich identifikaci. Zmiňuje klasické kultivační metody i mikroskopii. Tyto způsoby detekce jsou již nahrazeny moderními technikami, ale stále jsou nutnou součástí při diagnostice plísňových onemocnění. Největší prostor byl věnován způsobům detekce plísní. Své výhody a nevýhody mají oba dva zmiňované typy metod. K rozvoji molekulárně biologických metod došlo až v průběhu 90. let, předtím se používaly pouze klasické metody jako je mikroskopie, histopatologie a kultivace. Výhodou u klasických metod je ekonomická dostupnost. Naopak nevýhodou je časová náročnost, možná lidská chyba a mikroskopické metody vykazují velkou míru chybovosti. Jelikož je čas často rozhodujícím faktorem při diagnostice, bylo nutné tyto metody doplnit jinými, rychlejšími způsoby. Do popředí proto dnes vstupují molekulárně biologické metody.

Molekulárně biologické metody se začaly používat pro svoji časovou nenáročnost, přesnost, možnost identifikace více vzorků zároveň a malou chybovost. Další výhodou je porovnávání vzorků v daných databázích nebo knihovnách (GenBank). Bohužel nevýhodou může být finanční náročnost a drahá instrumentace a také neuniverzálnost některých molekulárních metod. V praxi se používají jenom některé molekulární metody. Jsou to metody založené na PCR, nejčastější typ je PCR v reálném čase, která je dnes nedílnou součástí většiny klinických laboratoří. U hybridizačních kyselin se používá metoda FISH. Běžnou metodou v nemocničních i jiných laboratořích se stala metoda MALDI TOF MS.

U techniky sekvenování není použití v klinických laboratořích příliš rozšířené pro vysoké pořizovací náklady a nutnost dobře proškoleného personálu. Tato metoda je tak spíše využívána na vědeckých pracovištích, kde se běžně využívají metody druhé generace. Do budoucna lze očekávat rozvoj metod třetí generace a jejich dominanci na poli sekvenace.

Svoji roli na poli identifikaci plísní si získaly i komerčně dostupné testy jako je Acoprobe test pro svoji relativní jednoduchost a rychlost. Předmětem zájmu bude v budoucích letech také užití T2 test pro magnetickou rezonanci pro jiné mikroorganismy než *Candida*.

6 SEZNAM LITERATURY

ABLIZ, Paride, Kazutaka FUKUSHIMA, Kayoko TAKIZAWA, Norikazu NIEDA, Makoto MIYAJI a Kazuko NISHIMURA. Rapid Identification of the Genus *Fonsecaea* by PCR With Specific Oligonucleotide Primers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, 41(2), 873–876. ISSN 0095-1137.

ARDUI, Simon, Adam AMEUR, Joris R. VERMEESCH a Matthew S. HESTAND. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Resarchs*. 2018, 46(5), 2159–2168. ISSN 0305-1048.

ARYA, Manit, Iqbal S. SHERGILL, Magali WILLIAMSON, Lyndon GOMMERSALL, Neehar ARYA a Hitendra RH PATEL. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2005, 5(2), 209-219. ISSN 1473-7159.

ARYAL, Sagar. <https://microbiologyinfo.com/sabouraud-dextrose-agar-sda-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/> [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na www: <https://microbiologyinfo.com/wp-content/uploads/2015/09/Colony-Morphology-on-SDA-2.jpg>

ATTIAS, MARCIA, KILDARE MIRANDA, WENDELL GIRARD-DIAS, WANDERLEY DE SOUZA a ISABELA RAMOS. Three Dimensionl Reconstruction by Electron Microscopy in the Life Sciences: An introduction for Cell and Tissue Biologists. *Molecular Reproduction and Development*. 2015, 82(7-8), 530-547. ISSN 1098-2795.

AYATOLLAHI-MOUSA VI, Seyyed Amin, Gholamreza ASADIKARAM, Nouzar NAKHAE E, Alireza IZADI a Nasser NASSER KEIKHA. The Effects of Opium Addiction on the Immune System Function in Patients with Fungal Infection. *Addiction & Health*. 2016, 8(4), 218–226. ISSN 2008-4633.

AZAR, Marwan M. a Chadi A. HAGE. Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017, 55(6), 1612-1620. ISSN 0095-1137.

BABU, Gopal Venkatesh, Palani PERUMAL, Sakthivel MUTHU, Sridhar PICHA I, Karthik Sankar NARAYAN a Sathuvan MALAIRAJ. Enhanced method for High Spatial Resolution surface imaging and analysis of fungal spores using Scanning Electron Microscopy. *Scientific Reports*. 2018, 8(16278), 1-10. ISSN 2045-2322.

BALAJEE, S. ARUNMOZHI, LYNNE SIGLER a MARY E. BRANDT. DNA and the classical way: Identification of medically important molds in the 21st century. *Medical Mycology*. 2007, 45(6), 475–490. ISSN 1369-3786.

BARON, Ellen Jo, J. Michael MILLER, Melvin P. WEINSTEIN, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013, 57(4), 22-121. ISSN 1537-6591.

BARTNICKI-GARCIA, Salomon. The evolution of fungal morphogenesis, a personal account. *Mycologia*. 2016, 108(3), 475-484. ISSN 0027-5514.

BASU, Srijoni, Chandra BOSE, Nupur OJHA, Nabajit DAS, Jagaree DAS, Mrinmoy PAL a Sukant KHURANA. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation*. 2015, 11(4), 182–184. ISSN 0973-2063.

BEAUVAIS, Anne. <https://www.aspergillus.org.uk/content/invasive-aspergillosis-microscopy> [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na [www: https://www.aspergillus.org.uk/sites/default/files/pictures/styles/galleryformatter_slide/public/combined_images/IPA%20microscopy%201.jpg?itok=PjlfWX2Y](https://www.aspergillus.org.uk/sites/default/files/pictures/styles/galleryformatter_slide/public/combined_images/IPA%20microscopy%201.jpg?itok=PjlfWX2Y)

BLACKWELL, Meredith. THE FUNGI: 1, 2, 3 ... 5.1 MILLION SPECIES? *American Journal of Botany*. 2011, 98(3), 426–438. ISSN 1537-2197.

BRATTOLI, Magda, Gianluigi DE GENNARO, Valentina DE PINTO, Annamaria Demarinis LOIOTILE, Sara LOVASCIO a Michele PENZA. Odour Detection Methods: Olfactometry and Chemical Sensors. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2011, 11(5), 5290-5322. ISSN 1424-8220.

BRINKMAN, Cassandra L., Paschalis VERGIDIS, James R. UHL, et al. PCR-Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Direct Detection of Pathogens and Antimicrobial Resistance from Heart Valves in Patients with Infective Endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013, 51(7), 2040-2046. ISSN 0095-1137.

BROWN, L., WOLF, J., PRADOS-ROSALES, R. ET AL. <https://www.nature.com/articles/nrmicro3480> [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na [www: https://media.springernature.com/lw685/springer-static/image/art%3A10.1038%2Fnmicro3480/MediaObjects/41579_2015_Article_BFnmicro3480_Fig1_HTML.jpg?as=webp](https://media.springernature.com/lw685/springer-static/image/art%3A10.1038%2Fnmicro3480/MediaObjects/41579_2015_Article_BFnmicro3480_Fig1_HTML.jpg?as=webp)

BUCHTA, Vladimír, Petr HAMAL, Naděžda MALLÁTOVÁ, Iva KOČMANOVÁ, Vanda CHREŇKOVÁ, Markéta ROUBALOVÁ a Petra OLÍŠAROVÁ. Nepodkročitelné minimum laboratorní diagnostiky invazivních mykotických infekcí – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM JEP. *Postgraduální medicína. Praha: Mladá Fronta*. 2010, 12(5), 76-81. ISSN 1212-4184.

CANALE, Claudio, Muhammad HANEEF, Luca CESERACIU, Ilker S. BAYER, José A. HEREDIA-GUERRERO a Athanassia ATHANASSIOU, 2017. *Advanced Materials From Fungal Mycelium: Fabrication and Tuning of Physical Properties*. *Scientific Reports*. 2017, 7(41292), 1-11. ISSN 2045-2322.

CARTER, Bradley S., Jonathan S. FLETCHER a Robert C. THOMPSON. Analysis of messenger RNA expression by in situ hybridization using RNA probes synthesized via in vitro transcription. *Methods*. 2010, 52(4), 322-331. ISSN 1095-9130.

CHAGNON, Pierre-Luc. Ecological and evolutionary implications of hyphal anastomosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 2014, 88(3), 437–444. ISSN 0168-6496.

CHARACTERISTICS OF FUNGI. Lumenlearning: Boundless Biology [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na [www: https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/characteristics-of-fungi/](https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/characteristics-of-fungi/)

CHINEDU, S. Nwodo, Angela O. ENI, Adebayo I. ADENIYI a Janet A. AYANGBEMI. Assessment of Growth and Cellulase Production of Wild-Type Microfungi Isolated from Ota, Nigeria. *Asian Journal of Plant Sciences* 2010, 9(3), 118-125. ISSN 1682-3974.

CHOI, Chang Geun; KIM, Jong-Myoung. http://www.e-fas.org/Upload/files/E-FAS/09_%EA%B9%80%EC%A2%85%EB%AA%85_06_28.pdf [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na [www: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn%3AANd9GcRCMMZKM5OZ9wZ7auzcjxEUHHsogHUUKLmI2Xb7XgL0nqQ0aNNV&usqp=CAU](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn%3AANd9GcRCMMZKM5OZ9wZ7auzcjxEUHHsogHUUKLmI2Xb7XgL0nqQ0aNNV&usqp=CAU)

ČÍŽKOVÁ, Kateřina, 2018. *Základy histochemických metod*. 1. Olomouc: Univerzita Palackého, 50 s. ISBN 978-80-244-5316-3.

COLOMBO, ARNALDO LOPES, ANGELA TOBÓN, ANGELA RESTREPO, FLAVIO QUEIROZ-TELLES a MARCIO NUCCI. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Medical Mycology*. 2011, 49(8), 785–798. ISSN 1369-3786.

COSTA-ORLANDI, Caroline B., Janaina C. O. SARDI, Nayla S. PITANGUI, et al. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. *Journal of Fungi*. 2017, 3(2), 1-24. ISSN 2309-608X.

CROXATTO, Antony, Guy PROD'HOM a Gilbert GREUB. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012, 36(2), 380–407. ISSN 0168-6445.

DEEPACHANDI, Bhagya, Sudath WEERASINGHE, Preethi SOYSA, Nadira KARUNAWEERA a Yamuna SIRIWARDANA. A highly sensitive modified nested PCR to enhance case detection in leishmaniasis. *BMC Infectious Diseases*. 2019, 2019, 1-10. ISSN 1471-2334.

FARRAIA, Mariana Valente, João Cavaleiro Rufo RUFO, Inês PACIÊNCIA, Francisca FRANCISCA, Luís DELGADO a André MOREIRA. The electronic nose technology in clinical diagnosis: A systematic review. *Porto Biomedical Journal*. 2019, 4(4), 1-13. ISSN 2444-8664.

FORIN, Niccolò, Sebastiano NIGRIS, Samuele VOYRON, Mariangela GIRLANDA, Alfredo VIZZINI, Giorgio CASADORO a Barbara BALDAN. Next Generation Sequencing of Ancient Fungal Specimens: The Case of the Saccardo Mycological Herbarium. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2018, 6(129), 1-19. ISSN 2296-701X.

FREY-KLETT, P., P. BURLINSON, A. DEVEAU, M. BARRET, M. TARKKA a A. SARNIGUET. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011, 75(4), 583–609. ISSN 1092-2172.

FUKUSHIMA, Kazutaka, Kayoko TAKIZAWA, Kazuko NISHIMURA a Paride ABLIZ. Specific Oligonucleotide Primers for Identification of *Cladophialophora carrionii*, a Causative Agent of Chromoblastomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, 42(1), 323–326. ISSN 0095-1137.

GARG, Jaya, Ragini TILAK, Sanjay SINGH, Anil Kumar GULATI, Atul GARG, Pradyot PRAKASH a Gopal NATH. Evaluation of Pan-Dermatophyte Nested PCR in Diagnosis of Onychomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, 45(10), 3443–3445. ISSN 0095-1137.

GARRIDO-CARDENAS, Jose Antonio, Federico GARCIA-MAROTO, Jose Antonio ALVAREZ-BERMEJO a Francisco MANZANO-AGUGLIARO. DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2017, 17(3), 1-15. ISSN 1424-8220.

GIGLIOTTI, Francis, Andrew H. LIMPER a Terry WRIGHT. Pneumocystis. *Cold Spring Harb Perspect Medicine*. 2014, 4(12), 1-14. ISSN 2157-1422.

GOENKA, Chhavi, William WILLIAM LEWIS, Lee Roger CHEVRES-FERNÁNDEZ, Antonio ORTEGA-MARTÍNEZ, Esmeralda IBARRA-SILVA, Maura WILLIAM a Walfre FRANCO. Mobile Phone-Based UV Fluorescence Microscopy for the Identification of Fungal Pathogens. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2014, 25(3), 319–323. ISSN 1096-9101.

- GONGORA, Andres, Javier MONROY a Javier GONZALEZ-JIMENEZ. An Electronic Architecture for Multipurpose Artificial Noses. *Journal of Sensors*. 2018, 2018, 1-9. ISSN 1687-725X.
- GOVINDARAJAN, Rajeshwar, Jeyapradha DURAIYAN, Karunakaran KALIYAPPAN a Murugesan PALANISAMY. Microarray and its applications. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2012, 4(2), 310–312. ISSN 0976-4879.
- GREGORY, David; MARSHALL, Debbie. <https://wellcomecollection.org/works/hbcfz3zu> [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na [www: https://www.iiif.wellcomecollection.org/image/B0003502.jpg/full/300/0/default.jpg](https://www.iiif.wellcomecollection.org/image/B0003502.jpg/full/300/0/default.jpg)
- GRIFFITH, Garth W., Gary L. EASTON, Andrew DETHERIDGE, Kevin RODERICK, Arwyn EDWARDS, Hilary J. WORGAN, Jean NICHOLSON a William T. PERKINS. Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, 276(2), 165–171. ISSN 0378-1097.
- GUARNER, Jeannette a Mary E. BRANDT. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011, 24(2), 247–280. ISSN 0893-8512.
- HAMZIA, Ali. https://www.researchgate.net/figure/20-Potato-Dextrose-Agar-Aryal-2015-a_fig12_329885156 [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na [www: https://www.researchgate.net/profile/Hamzia_Ali/publication/329885156/figure/fig12/AS:799436695416833@1567611969031/20-Potato-Dextrose-Agar-Aryal-2015-a.jpg](https://www.researchgate.net/profile/Hamzia_Ali/publication/329885156/figure/fig12/AS:799436695416833@1567611969031/20-Potato-Dextrose-Agar-Aryal-2015-a.jpg)
- HEATHER, James M. a Benjamin CHAIN. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016, 107(1), 1-8. ISSN 1089-8646.
- HONG, Gina, Heather B. MILLER, Sarah ALLGOOD, Richard LEE, Noah LECHTZIN a Sean X. ZHANGB. Use of Selective Fungal Culture Media Increases Rates of Detection of Fungi in the Respiratory Tract of Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017, 55(4), 1122–1130. ISSN 0095-1137.
- HU, Wenwen, Liangtian WAN, Yingying JIAN, et al. Electronic Noses: From Advanced Materials to Sensors Aided with Data Processing. *Advanced Materials Technologies*. 2019, 4(1800488), 1-38. ISSN 2365-709X.
- IMAI, T., A. SANO, Y. MIKAMI, et al. A New PCR Primer for the Identification of *Paracoccidioides Brasiliensis* Based on rRNA Sequences Coding the Internal Transcribed Spacers (ITS) and 5 X 8S Regions. *Medical Mycology*. 2000, 38(4), 323–326. ISSN 1369-3786.

- IVARSSON, Magnus, Anna SCHNÜRER, Stefan BENGTON a Anna NEUBECK. Anaerobic Fungi: A Potential Source of Biological H₂ in the Oceanic Crust. *Frontiers in Microbiology*. 2016., 7(674), 1-8. ISSN 1664-302X.
- JAKUBEK, Yasminka A. a David J. CUTLER. A model of binding on DNA microarrays: understanding the combined effect of probe synthesis failure, cross-hybridization, DNA fragmentation and other experimental details of affymetrix arrays. *BMC Genomic*. 2012, 13(737), 1-13. ISSN 1471-2164.
- JENSEN, Ellen. Technical Review: In Situ Hybridization. *The Anatomical Record*. 2014, 297(8), 1349-1353. ISSN 1932-8494.
- JONES, Mitchell P. https://www.researchgate.net/figure/Phylogenetic-tree-for-classification-Compiled-from-literature-27-28_fig6_318942381 [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na www:
https://www.researchgate.net/profile/Mitchell_P_Jones/publication/318942381/figure/fig7/AS:526496474374144@1502537949836/Phylogeny-and-classification-of-fungi-Basal-fungi-and-Dikarya-Branch-lengths-are-not.png
- JUNG, Boknam, Soyeon KIM a Jungkwan LEE. Microcycle conidiation in filamentous fungi. *Mycobiology*. 2014, 42(1), 1-5. ISSN 2092-9323.
- KARKOWSKA-KULETA, Justyna, Maria RAPALA-KOZIK a Andrzej KOZIK. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus**. *Acta Biochimica Polonica*. 2009, 56(2), 1-14. ISSN 1734-154X.
- KAZEMIAN, Negin, Sepideh PAKPOUR, Abbas S. MILANI a John KLIRONOMOS. Environmental factors influencing fungal growth on gypsum boards and their structural biodeterioration: A university campus case study. *PLoS One*. 2019, 14(8), 1-18. ISSN 1932-6203.
- KOLÍSKO, Martn. Moderní metody sekvenování DNA. *Živa*. 2017, 2017(3), 1-4. ISSN 0044-4812.
- KOURKOUMPETIS, Themistoklis K., Beth Burgwyn FUCHS, Jeffrey J. COLEMAN, Athanasios DESALERMOS a Eleftherios MYLONAKIS. Polymerase Chain Reaction–Based Assays for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012, 54(9), 1322–1331. ISSN 1058-4838.
- KOZEL, Thomas R. a Brian WICKES. Fungal Diagnostics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014, 4(4), 1-14. ISSN 2157-1422.

KRIFORS, Anders, Volkan ÖZENCI, Måns ULLBERG, Malin ACKEFORS, Martin JÄDERSTEN, Kristoffer STRÅLIN a Ola BLENNOW. PCR with electrospray ionization-mass spectrometry on bronchoalveolar lavage for detection of invasive mold infections in hematological patients. *PLoS One*. 2019, 14(2), 1-9. ISSN 1932-6203.

LAICH, Federico, Francisco FIERRO a Juan F. MARTÍN. Production of Penicillin by Fungi Growin on Food Products: Identification of a Complete Penicillin Gene Cluster in *Penicillium griseofulvum* and a Truncated Cluster in *Penicillium verrucosum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68(3), 1211–1219. ISSN 0099-2240.

LATGÉ, Jean-Paul. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. 2007, 66(2), 279–290. ISSN 1365-2958.

LIMA, Nelson; SANTOS, Cledir. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799317300206?via%3Dihub> [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na www: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2214799317300206-gr1.sml>

LIU, Ranran, Qiyao LI a Lloyd M. SMITH. Detection of large ions in time-of-flight mass spectrometry: effects of ion mass and acceleration voltage on microchannel plate detector response. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2014, 25(8), 1374–1383. ISSN 1044-0305.

LIU, Yu, George TORTORA, Maria E. MARIA E. RYAN, Hsi-Ming LEE a Lorne M. LORNE M. GOLUB. Potato Dextrose Agar Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts and Molds: Evaluation of Phosphate Effect on Antifungal Activity of CMT-3. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2002, 46(5), 1455–1461. ISSN 1098-6596.

LORENZ, Todd C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, 22(63), 1-15. ISSN 1940-087X.

MAHEASWARI, Rajendran, Jaishree Tukaram KSHIRSAGAR a Nallasivam LAVANYA. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2016, 20(2), 128–135. ISSN 0975-1580.

MAHESHWARI, Ramesh, Girish BHARADWAJ a Mahalingeshwara K. BHAT. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000, 64(3), 461–488. ISSN 1092-2172.

MARTIN, Yannick, Michel PAGE, Christophe BLANCHET a Hidde de JONG. WellInverter: a web application for the analysis of fluorescent reporter gene data. *BMC Bioinformatics*. 2019, 20(309), 1-18. ISSN 1471-2105.

- MCGAVIN, M. D. Factors Affecting Visibility of a Target Tissue in Histologic Sections. *Veterinary Pathology*. 2014, 51(1), 9-27. ISSN 0300-9858.
- MELLON, J. E., M. K. DOWD a S.B.Beltz BELTZ. Effects of Temperature and Medium Composition on Inhibitory Activities of Gossypol-Related Compounds Against Aflatoxigenic Fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 2013, 115, 179-186. ISSN 1365-2672.
- OLIVE, D. Michael a Pamela BEAN. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, 37(6), 1661–1669. ISSN 0095-1137.
- PARÁKOVÁ, Kristýna.
https://dspace.vsb.cz/bitstream/handle/10084/103519/PAR0041_HGF_B2102_3904R005_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na www.https://dspace.vsb.cz/bitstream/handle/10084/103519/PAR0041_HGF_B2102_3904R005_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- PATEL, Robin. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clinical Chemistry*. 2015, 61(1), 100–111. ISSN 0009-9147.
- PFALLER, Michael A., Donna M. WOLK a Thomas J. LOWERY. T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *FUTURE MICROBIOLOGY*. 2015, 11(1), 103–117. ISSN 1746-0913.
- POSTEK, Michael T., András E. VLADÁR, John S. VILLARRUBIA a Atsushi MUTO. Comparison of Electron Imaging Modes for Dimensional Measurements in the Scanning Electron Microscope. *Microscopy and microanalysis*. 2016, 22(4), 768–777. ISSN 1435-8115.
- POUNDER, June I., Sheri WILLIAMS, Dewey HANSEN, Mimi HEALY, Kristy REECE a Gail L. WOODS. Repetitive-Sequence-PCR-Based DNA Fingerprinting Using the DiversiLab System for Identification of Commonly Encountered Dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005, 43(5), 2141–2147. ISSN 0095-1137.
- PROCOP, Gary W. Molecular Diagnostics for the Detection and Characterization of Microbial Pathogens. *Clinical Infectious Diseases*. 2007, 45(2), 99–111. ISSN 1058-4838.
- PRUDENT, Elsa a Didier RAOULT. Fluorescence in situ hybridization, a complementary molecular tool for the clinical diagnosis of infectious diseases by intracellular and fastidious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2019, 43(1), 88–107. ISSN 0168-6445.
- RESLOVA, Nikol, Veronika MICHNA, Martin KASNY, Pavel MIKEL a Petr KRALIK. XMAP Technology: Applications in Detection of Pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8(55), 1-17. ISSN 1664-302X.

REUTER, Jason A., Damek SPACEK a Michael P. SNYDER. High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular cell*. 2015, 58(4), 586-597. ISSN 1097-4164.

RICKERTS, Volker, Prasanna D. KHOT, David MYERSON, Daisy L. KO, Evelyn LAMBRECHT a David N. FREDRICKS. Comparison of quantitative real time PCR with Sequencing and ribosomal RNA-FISH for the identification of fungi in Formalin fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Infectious Diseases*. 2011, 11(202), 1-12. ISSN 1471-2334.

RIQUELME, Meritxell, Jesús AGUIRRE, Salomon BARTNICKI-GARCÍA, et al. Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2018, 82(2), 1-47. ISSN 1092-2172.

ROQUE, H. D., R. VIEIRA, S. RATO a M. LUZ-MARTINS. Specific Primers for Rapid Detection of *Microsporum Audouinii* by PCR in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006, 44(12), 4336–4341. ISSN 0095-1137.

ROUSK, Johannes, Philip C. BROOKES a Erland BÅÅTH. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(6), 1589–1596. ISSN 0099-2240.

ROUZAUD, Claire, Roderick HAY, Olivier CHOSIDOW, Nicolas DUPIN, Anna PUEL, Olivier LORTHOLARY a Fanny LANTERNIER. Severe Dermatophytosis and Acquired or Innate Immunodeficiency: A Review. *Journal of Fungi*. 2015, 2(1). ISSN 2309-608X.

SAHAZA, J. H., E. DUARTE-ESCALANTE, C. CANTEROS, G. RODRÍGUEZ-ARELLANES, M. R. REYES-MONTES a M. L. TAYLOR. Analyses of the genetic diversity and population structures of *Histoplasma capsulatum* clinical isolates from Mexico, Guatemala, Colombia and Argentina, using a randomly amplified polymorphic DNA-PCR assay. *Epidemiology and Infection*. 2019, 147(e204), 1-7. ISSN 2000-8686.

SANGUINETTI, Maurizio a Brunella POSTERARO. Identification of Molds by MatrixAssisted Laser Desorption Ionization– Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017 55(2), 369–379. ISSN 0095-1137.

SCHAFFRINSKI, MEIKE. Versatile Fluorescent Staining of Fungi in Clinical Specimens by Using the Optical Brightener Blankophor. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, 37(8), 2694–2696. ISSN 0095-1137.

SCOGNAMIGLIO, Theresa, Riva ZINCHUK, Pramod GUMPENI a Davise H. LARONE. Comparison of Inhibitory Mold Agar to Sabouraud Dextrose Agar as a Primary Medium for Isolation of Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010, 48(5), 1924–1925. ISSN 0095-1137.

SEXTON, D. Joseph, Meghan L. BENTZ, Rory M. WELSH a Anastasia P. LITVINTSEVA. Evaluation of a new T2 Magnetic Resonance assay for rapid detection of emergent fungal pathogen *Candida auris* on clinical skin swab samples. *Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*. 2018, 61(10), 786-790. ISSN 1439-0507.

SHAHI, Sherminah, Bas BEERENS, Erik M. M. MANDERS a Martijn REPA. Dynamics of the Establishment of Multinucleate Compartments in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell*. 2014, 14(1), 78-85. ISSN 1535-9778.

SHIN, Jeong Hwan, Raymond RANKEN, Susan E. SEFERS, et al. Detection, Identification, and Distribution of Fungi in Bronchoalveolar Lavage Specimens by Use of Multilocus PCR Coupled with Electrospray Ionization/Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013, 51(1), 136–141. ISSN 0095-1137.

SIMNER, Patricia J., James R. UHL, Leslie HALL, Michelle M. WEBER, Robert C. WALCHAK, Seanne BUCKWALTER a Nancy L. WENGENACK, 2013. Broad-Range Direct Detection and Identification of Fungi by Use of the PLEX-ID PCR-Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) System. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013, 51(6), 1699–1706. issn 0095-1137.

SNYDER, Abigail B., Megan N. BIANGO-DANIELS, Kathie T. HODGE a Randy W. WOROBO. Nature Abhors a Vacuum: Highly Diverse Mechanisms Enable Spoilage Fungi to Disperse, Survive, and Propagate in Commercially Processed and Preserved Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019, 18(2019), 286-304. ISSN 1541-4337.

SPATAFORA, Joseph W., Ying CHANG, Gerald L. BENNY, et al. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. 2016, 108(5), 1028-1046. ISSN 0027-5514.

SPIGAGLIA, Patrizia a Paola MASTRANTONIO. Evaluation of Repetitive Element Sequence-Based PCR as a Molecular Typing Method for *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, 41(6), 2454–2457. ISSN 0095-1137.

SUCHORAB, Zbigniew, Magdalena FRĄC, Łukasz GUZ, Karolina OSZUST, Grzegorz LAGÓD, Agata GRYTA, Nina BILIŃSKA-WIELGUS a Jacek CZERWIŃSKI. A method for early detection and identification of fungal contamination of building materials using e-nose. PLoS One. 2019, 14(4), 1-17. ISSN 1932-6203.

T. PREMAMALINI,1B. T. AMBUJAVALLI,1S. ANITHA,1L. SOMU,2AND ANUPMA J. KINDO1.

https://www.researchgate.net/publication/224920159_Schizophyllum_Commune_a_Causative_Agent_of_Fungal_Sinusitis_A_Case_Report [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na [www:https://www.researchgate.net/publication/224920159/figure/fig1/AS:213879591313408@1428004276970/Periodic-Acid-Schiff-PAS-stain-shows-septate-fungal-hyphae-Magnification-40x_Q320.jpg](https://www.researchgate.net/publication/224920159/figure/fig1/AS:213879591313408@1428004276970/Periodic-Acid-Schiff-PAS-stain-shows-septate-fungal-hyphae-Magnification-40x_Q320.jpg)

TAJADINI, Mohamadhasan, Mojtaba PANJEHPOUR a Shaghayegh Haghjooy JAVANMARD. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. Advanced Biomedical Research. 2014, 3(85), 1-6. ISSN 2277-9175.

TEGELAAR, Martin a Han A. B. WÖSTEN. Functional distinction of hyphal compartments. Scientific Reports. 2017, 7(1), 1-6. ISSN 2045-2322.

THELWELL, Nicola, Stephen MILLINGTON, Antonio SOLINAS, James BOOTH a Tom BROWN. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. Nucleic Acids Resarchs. 2000, 28(19), 3752–3761. ISSN 1362-4962.

TORTOSA, Germán. <http://www.compostandociencia.com/2015/03/aerosoles-en-el-compostaje/> [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na [www:https://i1.wp.com/www.compostandociencia.com/wp-content/uploads/2015/03/640px-Aspergillus_fumigatus.jpg?w=640](https://i1.wp.com/www.compostandociencia.com/wp-content/uploads/2015/03/640px-Aspergillus_fumigatus.jpg?w=640)

TOTOMOCH-SERRA, Armando, Manlio F. MARQUEZ a David E. CERVANTES-BARRAGÁN. Sanger sequencing as a first-line approach for molecular diagnosis of Andersen-Tawil syndrome. F1000Research. 2017, 6(1016), 1-7. ISSN 2046-1402.

UMEYAMA, Takashi, Ayako SANO, Katsuhiko KAMEI, Masakazu NIIMI, Kazuko NISHIMURA a Yoshimasa UEHARA. Novel Approach to Designing Primers for Identification and Distinction of the Human Pathogenic Fungi *Coccidioides Immitis* and *Coccidioides Posadasii* by PCR Amplification. Journal of Clinical Microbiology. 2006, 44(5), 1859–1862. ISSN 0095-1137.

VALERO, Clara, Laura DE LA CRUZ-VILLAR, Óscar ZARAGOZA a María José BUITRAGO. New Panfungal Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016, 54(12), 2910–2918. ISSN 0095-1137.

VEASEY, John Verrinder, Ricardo Bertozzi DE AVILA, Barbara Arruda Fraletti MIGUEL a Laura Hitomi MURAMATU. White piedra, black piedra, tinea versicolor, and tinea nigra: contribution to the diagnosis of superficial mycosis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2017, 92(3), 413–416. ISSN 0365-0596.

VELEGRAKI, A., M. KAMBOURIS, A. KOSTOUROU, G. CHALEVELAKIS a N. J. LEGAKIS. Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification. *Medical Mycology*. 1999, 37(1), 69–73. ISSN 1369-3786.

VERMA, Shikha, Binod Kumar THAKUR, Vandana RAPHAEL a Devinder Mohan THAPPA. Epidemiology of Subcutaneous Mycoses i Northeast India: A Retrospective Study. *Indian Journal of Dermatology*. 2018, 63(6), 496–501. ISSN 0019-5154.

VITÁČKOVÁ. <http://docplayer.cz/108052499-Laboratorni-diagnostika-plisni-rodu-fusarium.html> [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na www: <https://docplayer.cz/docs-images/92/108052499/images/34-0.jpg>

WALKOVÁ, R., H. JANOUŠKOVCOVÁ, M. ŠNAJDROVÁ, V. HUBKA, A. ČMOKOVÁ a J. HRABÁK. Identifikace dermatofytů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. *Československá dermatologie*. 2018, 93(6), 205–292. ISSN 1805-448X.

WEI, Hua, Caitlin THERRIEN, Aine BLANCHARD, Shengxi GUAN a Zhenyu ZHU1. The Fidelity Index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases. *Nucleic Acids Resarchs*. 2008, 36(9). ISSN 1362-4962.

WEINHOLD, Bob. A Spreading Concern: Inhalational Health Effects of Mold. *Environmental Health Perspectives*. 2007, 115(6), 300-305. ISSN 0091-6765.

WICKER, Thomas, Edith SCHLAGENHAUF, Andreas GRANER, Timothy J. CLOSE, Beat KELLER a Nils STEIN. 454 sequencing put to the test using the complex genome of barley. *BMC Genomics*. 2006, 7(275), 1-11. ISSN 1471-2164.

WICKES, Brian L. a Nathan P. WIEDERHOLD. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nature Communications*. 2018, 2018(9), 1-13. ISSN 2041-1723.

WILSON, Alphus D. a Manuela BAIETTO. Advances in Electronic-Nose Technologies Developed for Biomedical Applications. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2011, 11(1), 1105–1176. ISSN 1424-8220.

WINEY, Mark, Janet B. MEEHL, Eileen T. O'TOOLE a Thomas H. GIDDINGS, JR. Conventional transmission electron microscopy. *Molecular biology of the cell*. 2014, 25(3), 1-5. ISSN 1939-4586.

XXPRESSPCR. <https://www.xxpresspcr.com/all-news/polymerase-chain-reaction-the-past-present-and-future/> [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na [www: https://www.xxpresspcr.com/wp-content/uploads/PCR-steps.png](http://www.xxpresspcr.com/wp-content/uploads/PCR-steps.png)

YEO, Siew Fah a Brian WONG. Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, 15(3), 465–484. ISSN 0893-8512.

YUNYOUNG C. CHANG, MD CAMPBELL STEWART, MD EMILY Y. CHU, MD, PHD. <https://www.mdedge.com/dermatology/article/100367/dermatopathology/rare-angioinvasive-fungal-infection-association-leukemia> [online]. [cit. 14.6.2020]. Dostupný na [www: https://mdedge-files-live.s3.us-east-2.amazonaws.com/files/s3fs-public/images/RTEmagicC_CT095060332_Fig3B.jpg](http://www.mdedge-files-live.s3.us-east-2.amazonaws.com/files/s3fs-public/images/RTEmagicC_CT095060332_Fig3B.jpg)

ZWIRGLMAIER, Katrin. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) – the next generation. *FEMS Microbiology Letters*. 2005, 246(2), 151–158. ISSN 0378-1097.