Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

# TEORETICKÝ ÚVOD A PROTOKOLY Z LEKÁRSKEJ MYKOLÓGIE

Soňa Kucharíková

Helena Bujdáková

**Univerzita Komenského v Bratislave**

**2021**

© Autorky
RNDr. Soňa Kucharíková, PhD. [3,56 AH]
prof. RNDr. Helena Bujdáková, CSc. [0,8 AH]
2021

Rozsah 86 strán, 4,36 AH, prvé vydanie, vyšlo ako elektronická publikácia.

Kontakty na autorky:

RNDr. Soňa Kucharíková, PhD.
Trnavská univerzita v Trnave
Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce
Katedra laboratórnych vyšetrovacích metód v zdravotníctve
Univerzitné námestie 1
918 43 Trnava
E-mail: sona.kucharikova@truni.sk

prof. RNDr. Helena Bujdáková, CSc.
Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta
Katedra mikrobiológie a virológie
Ilkovičova 6
842 15 Bratislava
E-mail: helena.bujdakova@uniba.sk

Vydavateľ Univerzita Komenského v Bratislave

Dielo je vydané pod medzinárodnou licenciou Creative Commons CC BY-SA 4.0 (vyžaduje sa: povinnosť uvádzať pôvodného autora diela; povinnosť odvodené dielo zdieľať pod rovnakou licenciou ako pôvodné dielo). Viac informácií o licencii a použití diela: https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Uložené na: https://dspace.uniba.sk/xmlui/handle/123456789/28

ISBN 978-80-223-5204-8

**OBSAH**

**ÚVOD** 5

**ÚLOHA Č. 1: IDENTIFIKÁCIA *CANDIDA SPP.*** **6**

**A.** Teoretický úvod. 6

**B.** Protokol č. 1: Identifikácia *Candida spp.* na chromogénnom médiu CHROMagar™ Candida. 10

**C.** Protokol č. 2: Identifikácia *Candida spp.* na základe asimilácie a fermentácie cukrov pomocou API® 20 C AUX. 12

**D.** Protokol č. 3: Tranzícia *Candida albicans* z kvasinkovej formy do formy hýf (Germ Tube Test). 14

**E.** Zoznam použitej literatúry. 16

**ÚLOHA Č. 2: STANOVENIE CITLIVOSTI *CANDIDA SPP.* NA ANTIFUNGÁLNE LÁTKY** **20**

**A.** Teoretický úvod. 20

**B.** Protokol č. 1: Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) antifungálnych látok mikrodilučnou metódou. 25

**C.** Protokol č. 2: Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) antifungálnych látok pomocou E-testu. 27

**D.** Protokol č. 3: Stanovenie Minimálnej fungicídnej koncentrácie (MFC). 30

**E.** Zoznam použitej literatúry. 31

**ÚLOHA Č. 3: SCHOPNOSŤ ADHERENCIE A TVORBY BIOFILMU *CANDIDA SPP.*** **35**

**A.** Teoretický úvod. 35

**B.** Protokol č. 1: Sledovanie adherencie a tvorby biofilmov v jamkách 96-jamkovej mikrotitračnej platničky. 38

**C.** Protokol č. 2: Detekcia tvorby biofilmu XTT metódou. 39

**D.** Protokol č. 3: Stanovenie tvorby biofilmu kryštálovou violeťou. 41

**E.** Protokol č. 4: Príprava biofilmov v polyuretánových katétroch. 43

**F.** Protokol č. 5: Stanovenie tvorby biofilmu na základe kolónie tvoriacich jednotiek. 46

**G.** Zoznam použitej literatúry. 48

**ÚLOHA Č. 4: *CANDIDA ALBICANS – STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DUÁLNE BIOFILMY** **51**

**A.** Teoretický úvod. 51

**B.** Protokol č. 1: Príprava duálnych biofilmov v polyuretánových katétroch. 53

**C.** Protokol č. 2: Vyhodnotenie tvorby duálneho biofilmu na základe kolónie tvoriacich jednotiek (CFU). 57

**D.** Zoznam použitej literatúry. 60

**ÚLOHA Č. 5: STANOVENIE EXPRESIE GÉNOV POČAS *CANDIDA ALBICANS* A *CANDIDA GLABRATA* BIOFILMU POLYMERÁZOVOU REŤAZOVOU REAKCIOU S REVERZNOU TRANSKRIPCIOU (RT qPCR)** **63**

**A.** Teoretický úvod. 63

**B.** Protokol č. 1: Izolácia RNA pomocou RiboPure™ – Yeast kit. 65

- Príprava *C. albicans* a *C. glabrata* planktonických a biofilm-tvoriacich buniek na izoláciu RNA. 65
- Izolácia RNA pomocou RiboPure – Yeast kit na základe odporúčania výrobcu s čiastočnou modifikáciou. 67
- Ošetrenie izolovanej RNA pomocou DNázy I na základe odporúčania výrobcu s čiastočnou modifikáciou. 68

**C.** Protokol č. 2: Prepis RNA do cDNA použitím Reverse Transcription System. 68

**D.** Protokol č. 3: Príprava reakčnej zmesi pomocou KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit. Nastavenie Real-Time PCR cyklera. 69

**E.** Vyhodnotenie výsledkov Real-Time PCR pomocou metódy ΔΔct. 74

**F.** Zoznam použitej literatúry. 75

**VŠEOBECNÁ ČASŤ** **77**

Zásady bezpečnosti pri práci v mikrobiologickom laboratóriu 77

Laboratórne kmene 79

Postupy pre prípravu roztokov 80

Postupy pre prípravu antibiotík a antifungálnych látok 81

Postupy pre prípravu médií 82

Zoznam skratiek 85

# ÚVOD

Učebné texty „Teoretický úvod a protokoly z lekárskej mykológie“ sú zamerané na identifikáciu a charakterizáciu druhov rodu *Candida*. V týchto skriptách sme sa zamerali najmä na identifikáciu a charakteristiku faktorov virulence *Candida albicans* a *Candida glabrata*. *Candida albicans* je označená za najčastejšieho pôvodcu fungálnych infekcií u človeka, kdežto zo skupiny tzv. „*non – C. albicans*“ *Candida* species toto miesto patrí *C. glabrata*. Správna diagnostika pôvodcov mykotických infekcií je kľúčová pri následnej terapii pacientov. Tieto učebné texty poskytujú detailne spracované postupy vedúce k správnemu určeniu kandíd z neznámej vzorky, alebo klinického materiálu. Taktiež uvádzajú postupy k charakterizácii dôležitých virulenčných faktorov, ako napríklad schopnosť adherencie a tvorby biofilmu. Teoretický úvod a protokoly z lekárskej mykológie sú určené najmä pre študentov mikrobiológie prírodovedných odborov a príbuzných medicínskych disciplín. Tieto texty tvoria súčasť prednášok a cvičení, ktoré sa vyučujú v rámci predmetu Mykológia, Mikrobiológia a Vyšetrovacie metódy v mikrobiológii. Za odbornú stránku učebných textov zodpovedajú autorky.

# ÚLOHA Č. 1: IDENTIFIKÁCIA *CANDIDA SPP.*

## A. Teoretický úvod

Druhy *Candida spp*. sa považujú za komenzálne kvasinky, ktoré sa prirodzene nachádzajú v ústnej dutine, gastrointestinálnom trakte a na koži zdravých jedincov. Tieto mikroorganizmy však môžu pôsobiť aj ako oportúnne patogény, ktoré sú schopné vyvolať život ohrozujúce ochorenia najmä u pacientov so zníženou funkciou imunitného systému (Von Lilienfeld-Toal et al. 2019). Infekcie zapríčinené *Candida spp*. sa v posledných rokoch zvýšili v dôsledku rozsiahleho užívania širokospektrálnych antibiotík a rastúcim počtom HIV pozitívnych a imunokompromitovaných jedincov (Friedman and Schwartz 2019). *Candida albicans* je považovaná za najčastejšieho pôvodcu fungálnych invazívnych a mukokutánnych infekcií. Avšak v poslednom období sa do popredia dostávajú tzv. „*non-C. albicans Candida species*“, napríklad, *Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida tropicalis* a *Candida krusei* (Mellinghoff et al. 2018).

Antifungálny program SENTRY zameraný na monitorovanie druhovej distribúcie kandíd a ich rezistencie na antimykotiká zverejnil dáta z prvých 20 rokov sledovania veľkého počtu klinických izolátov z viacerých krajín sveta. Z ich pozorovania vyplynulo, že najrozšírenejším druhom spôsobujúcim invazívne kandidózy bola *C. albicans*, avšak podľa dát Pfaller et al. (2019), sa podiel infekcií spôsobených touto kvasinkou za 20 rokov znížil (Pfaller et al. 2019). Napríklad, v USA, je v súčasnosti viac ako 30 % prípadov kandidémie spôsobených „*non – C. albicans*“ patogénnou kvasinkou *C. glabrata*, ktorá je charakteristická „*získanou rezistenciou*“ voči flukonazolu (Lamoth et al. 2018). Navyše, u 10 % z týchto klinických izolátov bola detegovaná rezistencia voči najnovšej skupine antifungálnych látok echinokandínom (mikafungín, kaspofungín a anidulafungín) (Alexander et al. 2013). Okrem *C. glabrata* sa do popredia dostáva i ďalšia patogénna kvasinka *C. parapsilosis*. Výskyt infekcií spôsobených *C. parapsilosis* je alarmujúci, pretože sa javí vysokou mierou rezistencie voči antimykotikám (Lamoth et al. 2018; Vasilyeva et al. 2018). Okrem toho, táto kvasinka býva často izolovaná v zdravotníckych zariadeniach.

Asi najviac znepokojujúcu zmenu v epidemiológii invazívnej kandidózy celosvetovo predstavuje identifikácia *Candida auris*, kvasinky, ktorá odoláva účinku viacerých antimykotík. *C. auris* bola po prvýkrát popísaná v Japonsku v roku 2009 (Satoh et al. 2009). Odvtedy bola jej detekcia hlásená z ďalších krajín. Medzi dôležité faktory virulencie *C. auris*

patrí schopnosť adherencie a tvorby biofilmu (Singh et al. 2019), produkcia fosfolipáz a proteináz (Larkin et al. 2017) a rezistencia voči existujúcim antifungálnym látkam (Lockhart et al. 2017). Väčšina klinických izolátov *C. auris* preukázala rezistenciu voči flukonazolu a zníženú citlivosť na amfotericín B (Lockhart 2019). Navyše, *C. auris* má tendenciu kolonizovať hospitalizovaných pacientov po celé týždne až mesiace čo vedie k efektívnemu prenosu v zdravotníckych zariadeniach (Eyre et al. 2018). Rezistencia *C. auris* voči echinokandínom, liečivám, ktoré sa odporúčajú ako prvotná voľba pri terapii kandidémie, bola tiež popísaná (Kordalewska et al. 2018). Rizikové faktory, ktoré predstavujú predispozíciu pre vznik kandidémie zapríčinenej *C. auris* sú spojené s hospitalizáciou v nemocniciach, profylaxiou, vaskulárnou chirurgiou a prítomnosťou močových katétrov (Gonzalez-Lara and Ostrosky-Zeichner 2020).

Morfologické a fyziologické vlastnosti kvasiniek slúžia na bežnú identifikáciu druhov rodu *Candida*. Presná identifikácia izolátov získaných z klinických vzoriek je však často zložitá a časovo náročná. Napríklad, detekcia *Candida spp*. vo vzorke krvi sa stanovuje po detekcii 1 kolónie tvoriacej jednotky v 1 ml kultúry (1 CFU – Colony Forming Units/ml). Prítomnosť kandíd v krvných kultúrach sa hodnotí pozitívne počas aktívnej manifestácie ochorenia (Pfeiffer et al. 2011). Medzi tradičné metódy identifikácie kvasiniek z klinických vzoriek patrí napríklad, tvorba výpučkov (Germ - Tube test) a schopnosť asimilácie dusíkatých látok a karbohydrátov (Hoppe and Frey 1999). Enzymatické testy sa využívajú na rýchlu identifikáciu kandíd (Freydiere et al. 2001). V poslednom období sa do popredia dostávajú molekulárne metódy, ktoré sú založené na typizácii kandíd (Camp et al. 2020), avšak pre veľkú väčšinu laboratórií sú pomerne finančne náročné a nepraktické.

CHROMagar Candida (Becton Dickinson, USA) obsahuje zmes chromogénnych substrátov, ktoré reagujú s vylučovanými enzýmami mikroorganizmov. Výsledkom týchto reakcií sú rôzne sfarbené kolónie. Tieto enzýmy sú druhovo špecifické a dovoľujú identifikáciu organizmov na úrovni druhov. *C. albicans* rastie na bledozeleno, *C. tropicalis* má kolónie sfarbené na modro s metalickým odleskom, kým *C. krusei* je charakteristická rúžovým zafarbením s bielymi okrajmi (Pfaller et al. 1996). CHROMagar Candida uľahčuje detekciu a identifikáciu kvasiniek zo zmiešaných kultúr a môže poskytnúť výsledky o 24 až 48 hodín skôr ako štandardné postupy izolácie a identifikácie (Horvath et al. 2003). Nevýhodou tohto systému je fakt, že niektoré kvasinky môžu mať podobne sfarbené kolónie, ale ide o 2 odlišné druhy. Typickým príkladom je sfarbenie kolónií *C. albicans* rastúcich na CHROMagare Candida, ktoré je veľmi podobné zafarbeniu buniek *Candida dubliniensis*. Avšak, posledné publikácie naznačili, že tmavozelený vzhľad *C. dubliniensis* možno spoľahlivo odlíšiť od bledozeleného

rastu *C. albicans* (Jabra-Rizk et al. 2001; Odds and Davidson 2000). Na druhej strane, identifikácia *C. glabrata* na CHROMagare Candida zostáva protikladná. Niektorí autori tvrdia, že *C. glabrata* je na CHROMagare Candida ľahko identifikovateľná podľa tmavo rúžových až fialovo sfarbených kolónií (Jabra-Rizk et al. 2001; Odds and Davidson 2000; Lopez-Ribot et al. 1999). Iní autori zase považujú chromogénne médiá na identifikáciu *C. glabrata* za nespoľahlivé (Beighton et al. 1995; Freydière et al. 1997). Napriek tomu, CHROMagar Candida predstavuje prvotné médium, ktoré sa dá použiť na primárnu izoláciu kvasiniek z klinických vzoriek vrátane krvných kultúr. Použitie chromogénnych médií by mohlo umožniť mykologickým laboratóriám rýchlejšiu identifikáciu klinicky dôležitých druhov *Candida spp*.

Identifikácia *Candida spp*. na základe asimilácie substrátu je veľmi jednoduchá, relatívne lacná a ľahko dostupná metóda založená na raste mikroorganizmu v prítomnosti chemicky čistých substrátov. Schopnosť klinických izolátov asimilovať skupinu špecifických uhľohydrátov ako jediného zdroja uhlíka sa bežne používa pri identifikácii kvasiniek (Albaina et al. 2015). Asimilačné schopnosti je možné detegovať odlišnými metódami. Tieto metódy využívajú Yeast Nitrogen Base (YNB) ako základné médium, ktoré stimuluje proliferáciu kandíd po pridaní vhodného substrátu. Pri prvej metóde testovania sa roztoky jednotlivých cukrov nechajú difundovať z jamiek vyrezaných do stuhnutého média, ktoré obsahuje všetky živiny nevyhnutné pre rast mikroorganizmu okrem uhlíka. Kruhová zóna, tzv. *haló*, vzniknutá okolo jamiek naznačuje skvasovanie sacharidov (Silverman et al. 1990). Podobnú metódu detekcie schopnosti využitia špecifického cukru ako jediného zdroja uhlíka predstavuje použitie diskov, ktoré sú nasiaknuté maltózou, trehalózou, xylózou, galaktózou, laktózou a sukrózou. Disky obsahujúce glukózu slúžia v tomto prípade ako kontrola. Asimilácia zdroja uhlíka nastáva pri vzniku haló zóny v okolí daného disku (Marinho et al. 2010). Pri nasledujúcej metóde sa asimilácia substrátov *Candida spp*. pozoruje v skúmavkách obsahujúcich rôzne zdroje uhlíka. V tomto prípade sa deteguje rast kandíd (Fenn et al. 1994). Pre rýchlu identifikáciu kvasiniek bolo vyvinutých niekoľko komerčne dostupných diagnostických súprav, ktoré sú založené na asimilácii uhľohydrátov. Tieto komerčné metódy umožňujú pohodlnejšiu a rýchlejšiu identifikáciu druhov rodu *Candida*. Systém API 20 C vyvinutý firmou Analytab Products, Plainview, NY, USA, je jedným z prvých komerčne dostupných identifikačných súprav pre rýchlu detekciu kandíd. Tento systém bol nahradený API 20 C Aux (bioMérieux, Francúzsko). Jedna súprava sa skladá z 19 jamiek, z ktorých každá obsahuje dehydrovaný cukor. Schopnosť skvasovania jednotlivých zdrojov uhlíka sa vyhodnocuje na základe vzniknutého zákalu (Ameen et al. 2017). Výsledky sa vyhodnotia numericky a následne sa neznámy druh identifikuje podľa existujúceho zoznamu húb. *C. dubliniensis* sa dá od *C.*

*albicans* odlíšiť pomocou API 20 C Aux kvôli jej neschopnosti skvasovať xylózu a metyl-*α*-D-glukopyranozid (Loreto et al. 2010). Na druhej strane, identifikácia *C. krusei* použitím tohto systému zostáva diskutabilná (Freydiere et al. 2001). Pri tejto metóde je nevyhnutné mať zručnosti v oblasti prípravy súpravy a tiež pri vyhodnocovaní zákalu (Neppelenbroek et al. 2014).

Tvorba výpučkov, označovaná ako „*Germ-Tube test*“ predstavuje najlacnejší test odlíšenia *C. albicans* od ostatných druhov kandíd. Tento test je však časovo náročný a namáhavý, pretože zamestnanec daného laboratória musí vyšetriť 100 kvasinkových buniek predtým ako vyhodnotí pozitivitu/negativitu testu. Taktiež, pre správnu charakterizáciu výpučkov je nevyhnutné mať potrebné skúsenosti (Sheppard et al. 2008). Výpučok predstavuje neseptované rozšírenie kvasinkovej bunky, ktoré sa líši od pravých hýf tým, že v mieste spojenia s bunkou nemá žiadne zúženia. *C. albicans* iniciuje tvorbu týchto rúrkovitých štruktúr v prítomnosti séra za 2 – 3 h inkubáciou pri 37 °C (Clancy and Nguyen 2018). Ľudské sérum sa javí ako najlepšie podporné médium na identifikáciu *C. albicans* (Hilmioglu et al. 2007). Navyše, niektoré médiá, napríklad RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute), Lee (Lee et al. 1975) a Spider (Liu et al. 1994), indukujú tvorbu výpučkov. Obavou z použitia tejto techniky je fakt, že niektoré „*non -C. albicans Candida species*“, napríklad *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* a *C. parapsilosis*, vytvárajú v ľudskom sére „*výpučkom – podobné štruktúry*“, alebo pseudohýfy čo vedie k chybnej interpretácii výsledkov. Na základe týchto informácií je nevyhnutné implementovať pre správnu identifikáciu kvasiniek viacero metód, najlepšie kombináciu odlišných testov.

Novšie diagnostické, komerčne dostupné testy sa opierajú o identifikáciu kandíd na základe zložiek ich bunkovej steny, manánu a 1,3-*β*-D glukánu. Špecifické IgG protilátky namierené proti antigénom umiestnených na povrchu mycélia *C. albicans* (*C. albicans* Germ Tube Antibody – CAGTA) sa využívajú pre stanovenie prítomnosti kandíd v krvnom riečisku v európskych laboratóriách (Clancy and Nguyen 2018). Molekulárne metódy, napríklad polymerázová reťazová reakcia (PCR) sa tiež s obľubou používa na identifikáciu kandíd v klinických laboratóriách. Komerčne dostupné testy multiplex PCR sa vo všeobecnosti zameriavajú na identifikáciu piatich najčastejších pôvodcov invazívnych kandidóz (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* a *C. krusei*) vo väčšine nemocníc (Pfaller et al. 2011). Avšak, testy v laboratóriách sa môžu líšiť z hľadiska centra, krajiny, a laboratória.

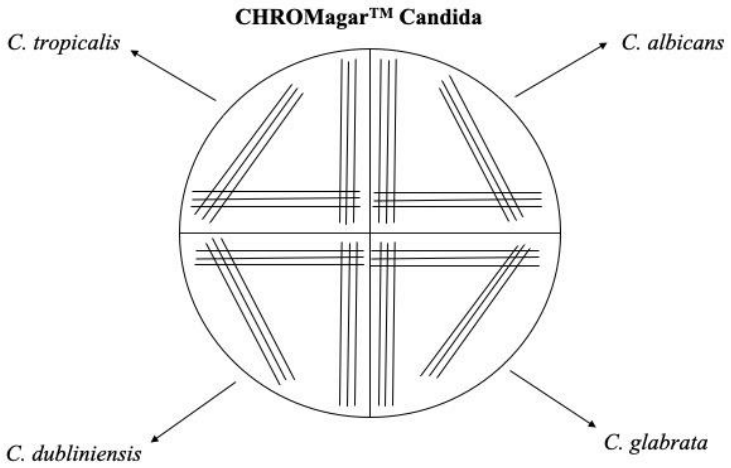
## B. Protokol č. 1: Identifikácia *Candida spp.* na chromogénnom médiu BBL™ CHROMagar™ Candida

**Pomôcky**

- *C. albicans* SC5314
- *C. glabrata* ATCC2001
- *C. tropicalis* ATCC 750
- *C. dubliniensis* CCY 29-177-1
- Komerčne vyrobené platne BBL™ CHROMagar™ Candida (Becton Dickinson, USA)
- Sabouraud dextrose agar
- Zberná nádoba na tuhý a tekutý odpad
- Sterilné očká
- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Vortex
- Termostat

**Pracovný postup**

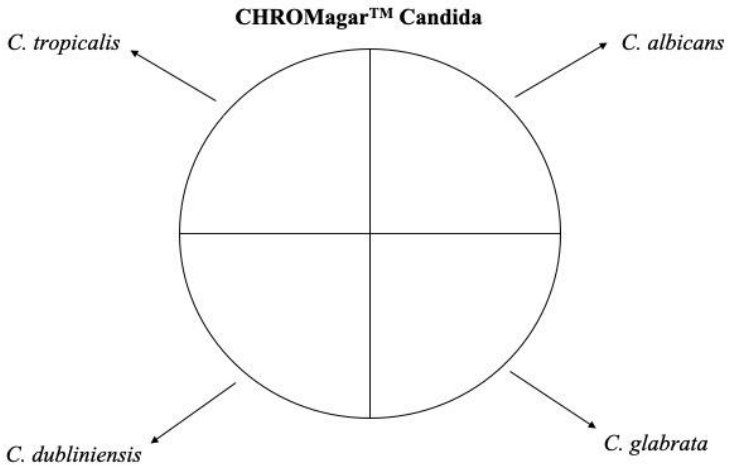
1) Pred inokuláciou vyberieme CHROMagar™ Candida misky z chladničky a necháme stáť pri izbovej teplote približne 30 min.
2) Zoberieme jednu samostatnú kolóniu buniek *Candida spp.* narastených na Sabouraudovom agare a rozotrieme ako je uvedené nižšie na obrázku č. 1.
3) Naočkované platne inkubujeme pri 37 °C, 48 h.




**Obrázok č. 1.** Schématická inokulácia BBL™ CHROMagar™ Candida Petriho misky. *Candida spp*. musia byť rozotreté tzv. šikmým rozterom na samostatné kolónie.

## Vyhodnotenie

Na obrázku farebne vyznačte rast jednotlivých kandíd. Výsledok zapíšte do protokolu.




## Poznámky

.....

.....

.....

.....

.....

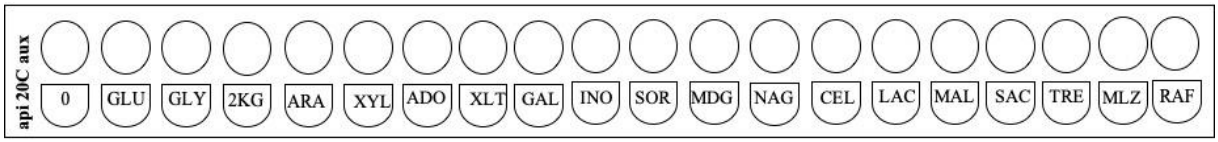
## C. Protokol č. 2: Identifikácia *Candida spp.* na základe asimilácie a fermentácie cukrov pomocou API® 20 C AUX

**Pomôcky**

- Neznámy mikroorganizmus č. 1
- Neznámy mikroorganizmus č. 2
- API® 20 C AUX systém (bioMérieux, Francúzsko)
- McFarland štandard č. 2
- Ľudské sérum
- Fyziologický roztok
- Sterilná destilovaná voda
- Sabouraud dextrose agarové platne
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Zberná nádoba na tuhý a tekutý odpad
- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Pasteurova pipeta
- Vortex
- Termostat

**Pracovný postup**

1) Najskôr si pripravíme sadu API® 20 C AUX systému, ktorá je komerčne dostupná a znázornená na obrázku č. 2. V tabuľke č. 1 sú uvedené skratky jednotlivých sacharidov.




**Obrázok č. 2.** Schématické znázornenie sady API® 20 C aux.

**Tabuľka č. 1.** Prehľad sacharidov používaných pri identifikácii kandíd na základe asimilácie a fementácie cukrov pomocou API® 20 C AUX.

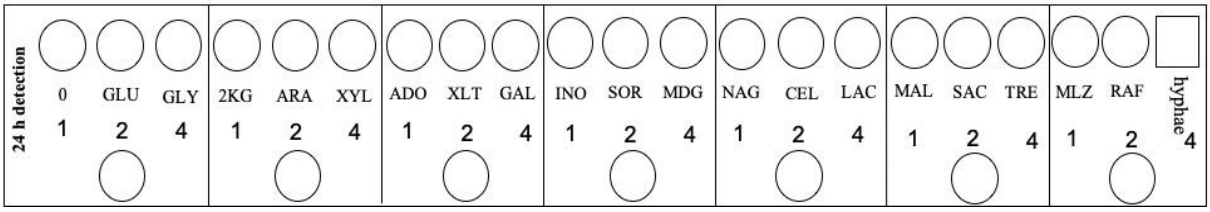
| Skratka daného cukru | Cukor |
|---|---|
| GLU | D-glukóza |
| GLY | glycerol |
| 2KG | kalcium 2-keto-glukonát |
| ARA | L-arabinóza |
| XYL | D-xylóza |
| ADO | adonitol |
| XLT | xylitol |
| GAL | D-galaktóza |
| INO | inozitol |
| SOR | D-sorbitol |
| MDG | metyl-$\alpha$-D-glukopyranozid |
| NAG | N-acetyl-glukózamín |
| CEL | D-celobióza |
| LAC | D-laktóza |
| MAL | D-maltóza |
| SAC | D-sacharóza |
| TRE | D-trehalóza |
| MLZ | D-melezitóza |
| RAF | D-rafinóza |

2) Do krytu súpravy rovnomerne napipetujeme sterilnú destilovanú vodu. Tento krok vedie k vytvoreniu vlhkého prostredia.
3) Pomocou pipety prenesieme 3 samostatné kolónie neznámeho mikroorganizmu do 2 ml fyziologického roztoku.
4) Koncentráciu neznámeho mikroorganizmu upravíme na hustotu buniek podľa 2. stupňa McFarlanda.
5) Z takto pripravenej suspenzie prenesieme 2 kvapky (približne 40 µl) do ľudského séra.
6) Inkubujeme pri 37 °C, 2 h za mierneho trepania. Tento test slúži na zistenie tvorby výpučkov a pravých hýf.
7) Následne prenesieme 100 µl suspenzie kvasiniek do ampulky s médiom C.
8) Jemne premiešame bez vytvorenia bublín.

9) Pomocou Pasteurovej pipety pipetujeme obsah ampulky pripravenej v bode 6 do jednotlivých jamiek až po okraj.
10) Takto pripravenú sadu prenesieme do krytu so sterilnou vodou.
11) Inkubujeme pri 30 °C, 24 – 48 h.

**Vyhodnotenie**

Do vyššie uvedených políčok napíšeme znamienko plus (+) ak príde ku skvasovaniu daného sacharidu a znamienko mínus (-) ak nie. Pozitívne hodnoty spočítame a koncové číslo uvedieme do nižšie uvedeného políčka. Znamienkom + alebo - taktiež označíme tvorbu pravých hýf. Výsledné hodnoty porovnáme s existujúcim katalógom a detegujeme neznámy mikroorganizmus. Výsledky uvedieme do protokolu.




**Poznámky**

.....

.....

.....

.....

.....

**D. Protokol č. 3: Tranzícia *Candida albicans* z kvasinkovej formy do formy hýf (Germ Tube Test)**

**Pomôcky**

- *C. albicans* SC5314
- Fetálne bovínne sérum (Sigma Aldrich, USA)
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Plastové kyvety na meranie OD
- Sterilná destilovaná voda
- YPD médium

- YP médium (médium bez prítomnosti glukózy)
- YPD agarové platne
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Vortex
- Centrifúga
- Termostat
- Spektrofotometer (na meranie OD)
- Svetelný mikroskop

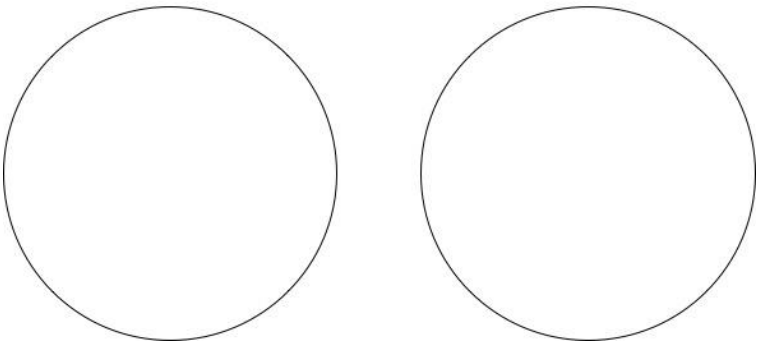
**Pracovný postup**

1) Z čerstvej kultúry *C. albicans* SC5314 narastenej na YPD platni prenesieme jedno očko do 3 ml tekutého YPD média v skúmavke.
2) Inkubujeme pri 30 °C za stáleho trepania (200 rpm) cez noc.
3) Kvasinky z celonočnej kultúry prenesieme do Eppendorf skúmavky (2 ml) a centrifugujeme (5 000 rpm) pri izbovej teplote.
4) Supernatant vylejeme do zbernej nádoby a pelet rozpustíme v 2 ml sterilnej vody a opäť premyjeme.
5) Bunky rozpustíme v sterilnej vode (20 ml) a inkubujeme 2 h, pri 30 °C (perióda hladovania).
6) Bunky centrifugujeme (5 000 rpm) pri izbovej teplote a spektrofotometricky stanovíme koncentráciu buniek pri optickej denzite 600 nm ($OD_{600}$).
7) Upravíme koncentráciu buniek na 1 x $10^6$ buniek/ml a suspenziu prenesieme do YP média s 10 % Fetálnym bovínnym sérom.
8) Kultúru inkubujeme pri 37 °C, 1.5 h – 2 h za stáleho trepania.
9) Množstvo výpučkov *versus* kvasiniek stanovíme pozorovaním svetelným mikroskopom pri zväčšení 40 x.

**Vyhodnotenie**

Do políčok nakreslíme kvasinkovú formu *C. albicans* a výpučky. Výsledky zaznačíme do protokolu.

***C. albicans* kvasinky** ***C. albicans* výpučky**



**Poznámky**

.....

.....

.....

.....

.....

## E. Zoznam použitej literatúry


Albaina O, Sahand IH, Brusca MI, Sullivan DJ, De Larrinoa IF, Moragues MD. Identification and characterization of nine atypical Candida dubliniensis clinical isolates. J Med Microbiol. 2015;64(2):147–56.

Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, et al. Increasing echinocandin resistance in candida glabrata: Clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. Clin Infect Dis. 2013;56(12):1724–32.

Ameen F, Moslem M, Al Tami M, Al-Ajlan H, Al-Qahtani N. Identification of Candida species in vaginal flora using conventional and molecular methods. J Mycol Med. 2017;27(3):364–8.

API® 20 C aux Yeast Identification System. Ref. 20 210. bioMèrieux SA, France. www.biomerieux.com

BBL™CHROMagar™Candida. Instructions for use. 8012620, Rev. 02, Febuary 2017, USA. www.bd.com

Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF, et al. Use of CHROmagar candida medium for isolation of yeasts from dental samples. J Clin Microbiol. 1995;33(11):3025–7.

Camp I, Spettel K, Willinger B. Molecular methods for the diagnosis of invasive candidiasis. J Fungi. 2020;6(3):1–14.

Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing invasive candidiasis. J Clin Microbiol. 2018;56(5):1–9.

Eyre DW, Sheppard AE, Madder H, Moir I, Moroney R, Quan TP, et al. A Candida auris Outbreak and Its Control in an Intensive Care Setting . N Engl J Med. 2018;379(14):1322–31.

Fenn JP, Segal H, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H, et al. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. J Clin Microbiol. 1994;32(5):1184–7.

Freydière AM, Buchaille L, Gille Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of Candida species in clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997;16(6):464–7.

Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: Phenotypical methods. Med Mycol. 2001;39(1):9–33.

Friedman DZP, Schwartz IS. Emerging fungal infections: New patients, new patterns, and new pathogens. J Fungi. 2019;5(3).

Gonzalez-Lara MF, Ostrosky-Zeichner L. Invasive Candidiasis. Semin Respir Crit Care Med. 2020 Feb;41(01):003–12.

Hilmioglu S, Ilkit M, Badak Z. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of Candida albicans and C. tropicalis. Mycoses. 2007;50(4):282–5.

Hoppe JE, Frey P. Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of Candida albicans. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999;18(3):188–91.

Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of Candida spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar Candida. J Clin Microbiol. 2003;41(6):2629–32.

Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, Baqui AAMA, Merz WG, Falkler J, et al. Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida. J Clin Microbiol. 2001;39(5):2015–6.

Kordalewska M, Lee A, Park S, Berrio I, Chowdhary A, Zhao Y, et al. Understanding echinocandin resistance in the emerging pathogen candida auris. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(6):1–9.

Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. J Antimicrob Chemother. 2018;73(January):i4–13.

Larkin E, Hager C, Chandra J, Mukherjee PK. crossm. 2017;61(5):1–13.

Lee KL, Buckley HR, Campbell CC. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycellal and yeast forms of candida albicans. Med Mycol. 1975;13(2):148–53.

Von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive Pilzinfektionen. Dtsch Arztebl Int. 2019;116(16):271–8.

Liu H, Köhler J, Fink GR. Suppression of hyphal formation in Candida albicans by mutation of a STE12 homolog. Science. 1994;266(5191):1723–6.

Lockhart SR. Candida auris and multidrug resistance: Defining the new normal. Fungal Genet Biol. 2019;131.

Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant candida auris on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. Clin Infect Dis. 2017;64(2):134–40.

Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Perea S, Kirkpatrick WR, Rinaldi MG, Patterson TF. Multiple resistant phenotypes of Candida albicans coexist during episodes of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus- infected patients. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(7):1621–30.

Loreto ÉS, Scheid LA, Nogueira CW, Zeni G, Santurio JM, Alves SH. Candida dubliniensis: Epidemiology and phenotypic methods for identification. Mycopathologia. 2010;169(6):431–43.

Marinho SA, Teixeira AB, Santos OS, Cazanova RF, Ferreira CAS, Cherubini K, et al. Identification of candida spp. by phenotypic tests and PCR. Brazilian J Microbiol. 2010;41(2):286–94.

Mellinghoff SC, Cornely OA, Jung N. Essentials in Candida bloodstream infection. Infection. 2018;46(6):897–9.

Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, et al. Identification of Candida species in the clinical laboratory: A review of conventional, commercial, and molecular techniques. Oral Dis. 2014;20(4):329–44.

Odds FC, Davidson A. “Room temperature” use of CHROMagar Candida(TM). Diagn Microbiol Infect Dis. 2000;38(3):147–50.

Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for Candida species from 1997-2016. Open Forum Infect Dis. 2019;6(Suppl 1):S79–94.

Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar candida for rapid screening

of clinical specimens for Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, and Candida (Torulopsis) glabrata. J Clin Microbiol. 1996;34(1):58–61.

Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. Candida bloodstream infections: Comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). Int J Antimicrob Agents. 2011;38(1):65–9. A

Pfeiffer CD, Samsa GP, Schell WA, Reller LB, Perfect JR, Alexander BD. Quantitation of Candida CFU in initial positive blood cultures. J Clin Microbiol. 2011;49(8):2879–83.

Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. Candida auris sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. Microbiol Immunol. 2009;53(1):41–4.

Sheppard DC, Locas MC, Restieri C, Laverdiere M. Utility of the germ tube test for direct identification of Candida albicans from positive blood culture bottles. J Clin Microbiol. 2008;46(10):3508–9.

Silverman S, Migliorati CA, Epstein JB, Samaranayake LP. Laboratory diagnosis of oral candidosis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW, editors. Oral Candidosis 1st ed. John Wright; 1990. p. 213–37.

Singh R, Kaur M, Chakrabarti A, Shankarnarayan SA, Rudramurthy SM. Biofilm formation by Candida auris isolated from colonising sites and candidemia cases. Mycoses. 2019;62(8):706–9.

Vasilyeva N V., Raush ER, Rudneva M V., Bogomolova TS, Taraskina AE, Fang Y, et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. Front Med. 2018;12(1):84–91.

# ÚLOHA Č. 2: STANOVENIE CITLIVOSTI *CANDIDA SPP.* NA ANTIFUNGÁLNE LÁTKY

## A. Teoretický úvod

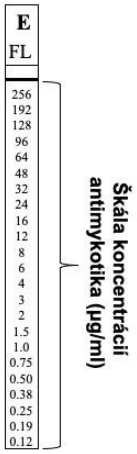
V poslednom období sa výrazne zvýšil počet *Candida spp*. klinických izolátov rezistentných voči existujúcim antimykotikám. Tento fenomén predstavuje seriózny medicínsky problém, ktorý ma veľký dopad na spoločnosť. Vzhľadom na tieto informácie je nevyhnutná potreba presného, reprodukovateľného a klinicky relevantného testovania citlivosti klinických izolátov. Tieto výsledky prispievajú k správnemu rozhodnutiu týkajúceho sa liečby pacienta.

Na stanovenie citlivosti sa v klinických laboratóriách, v rutinných podmienkach, využívajú viaceré metódy. Prvý medzinárodný štandard pre testovanie citlivosti kvasiniek bol zverejnený v roku 1997, v USA, Národným výborom pre klinické laboratórne štandardy (NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards, CLSI document M27-A2. 1997), ktorý sa neskôr premenoval na Inštitút pre klinické a laboratórne štandardy (CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute). CLSI spolu s Európskym výborom pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti (EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) vyvinuli štandardné metódy testovania citlivosti *Candida spp*. založené na mikrodilúcii média (CLSI document M27 – A3. 2008; CLSI document M44 – A2. 2009; Arendrup et al. 2012). Zatiaľ čo základné médium (RPMI1640 – MOPS), doba inkubácie (24 h) a kritériá odčítania výsledkov (výrazná inhibícia) sú rovnaké, rozdiely medzi týmito dvoma testovacími metódami sú nasledovné:

- veľkosť inokula ($0.5 \times 10^3$ až $2.5 \times 10^3$ buniek/ml (CLSI) *vs*. $0.5 \times 10^5$ až $2.5 \times 10^5$ buniek/ml (EUCAST),
- koncentrácia glukózy v médiu (0.2 % (CLSI) *vs*. 2.0 % (EUCAST),
- dno jamiek 96 – jamkovej polystyrénovej platničky: zaoblené (CLSI) *vs*. ploché dno (EUCAST) a
- stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC): vizuálne (CLSI) *vs*. spektrofotometrické (EUCAST)

Tieto metodické postupu boli zosúladené tak, aby pri interpretácii výsledkov MIC existovala kategorická zhoda (Pfaller et al. 2010). Okrem mikrodilučnej metódy testovania citlivosti

*Candida spp.*, CLSI vyvinula aj diskovú difúznu metódu s použitím agarových Petriho misiek. Táto metóda predstavuje alternatívu v rutinnej klinickej praxi, pretože je relatívne jednoduchá, lacná a vhodná pre vo vode rozpustné antifungálne látky, ako je flukonazol a vorikonazol. Disková difúzna metóda pre stanovenie citlivosti kandíd bola štandardizovaná pre flukonazol, vorikonazol, kaspofungín a mikafungín (CLSI document M44 – A2. 2009). Hraničné hodnoty detekcie citlivosti/rezistencie mikroorganizmov na antifungálne látky sa označujú ako „*breakpointy*“. Tieto hodnoty sú druhovo špecifické. Na uľahčenie spoľahlivej detekcie citlivosti/rezistencie kvasiniek a vláknitých húb na antimykotiká boli vyvinuté komerčné metódy stanovenia MIC. Porovnanie týchto metód s klasickou metódou detekcie MIC pomocou CLSI alebo Etestom sa označilo ako spoľahlivé (Posteraro and Sanguinetti 2014). V súčasnosti sú dostupné tri komerčné metódy stanovenia citlivosti *Candida spp.*: Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH, USA), Vitek 2 (bioMèrieux, Marcy l'Ètoile, Francúzsko) a Etest (bioMèrieux, Marcy l'Ètoile, Francúzsko) (Sanguinetti et al. 2015). Etest je znázornený na obrázku č. 3.




**Obrázok č. 3.** Etest používaný pre stanovenie MIC pomocou stripov napustených antifungálnou látkou. Škála koncentrácií danej antifungálnej látky je uvedená v µg/ml (v tomto špecifickom prípade ide o flukonazol (FL)) a je znázornená číselne na danom E-teste.

V porovnaní s antibiotikami, existuje iba limitované množstvo antifungálnych látok, ktoré sa využívajú pri terapii povrchových a diseminovaných fungálnych infekciách. Azoly, polyény, pyrimidínové analógy, allylamíny a echinokandíny predstavujú základné triedy antimykotík, ktoré sú dostupné na trhu.

***Azolové deriváty*** sú antifungálne liečivá s fungistatickým účinkom, ktoré sa s obľubou používajú pri terapii mykotických infekcií. Dajú sa klasifikovať do dvoch skupín: imidazoly a triazoly. Imidazoly boli prvými vyvinutými azolmi (mikonazol, klotrimazol a ketokonazol), avšak kvôli ich vysokej toxicite, vedľajším účinkom a početným interakciám s inými liekmi ich

nahradili triazoly (Shukla et al. 2016). Triazoly prvej generácie (flukonazol a itrakonazol), v porovnaní s imidazolmi, vykazujú širšie spektrum antifungálnych účinkov (Arendrup 2013). Flukonazol je účinný proti druhom *Candida spp*., *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma*, *Blastomyces* a *Coccidioides* (Campoy and Adrio 2017), kdežto itrakonazol vykazuje aktivitu i proti *Aspergillus spp*. (Giamarellos-Bourboulis et al. 2019). Druhú generáciu triazolov predstavuje vorikonazol a posakonazol, ktoré boli schválené FDA (US Food and Drug Administration) v roku 2002 a 2006. Vorikonazol prejavil aktivitu proti *Aspergillus spp*., *Fusarium spp*. a *Candida spp*. vrátane klinických izolátov *C. glabrata* a *C. krusei* rezistentných voči flukonazolu (Rosanova et al. 2018). Posakonazol má širokospektrálnu aktivitu proti *Candida spp*. a *Aspergillus spp.* a druhom rodu *Mucorales* (Chen et al. 2020). Taktiež sa využíva pri profylaxii mykotických infekcií u imunokompromitovaných pacientov a príjemcov transplantácií (Clark et al. 2015). Isavukonazol patrí do skupiny triazolov so širokým spektrom účinku proti kvasinkám, dimorfným hubám a plesniam (Ellsworth and Ostrosky-Zeichner 2020). Používa sa na liečbu invazívnej aspergilózy a mukormykózy. V porovnaní s inými azolmi, má zvýšenú aktivitu proti druhom rodu *Zygomycetes*, ako napríklad *Rhizopus spp*., *Mucor spp*. a *Cunninghamella spp*. (Campoy and Adrio 2017).

Mechanizmus účinku azolov spočíva v interferencii s enzýmom lanosterol 14-α-demetyláza, ktorý sa podieľa na biosyntéze ergosterolu v bunkovej stene húb. Inhibícia tohto enzýmu azolmi spôsobuje narušenie funkcie bunkovej membrány čo vedie k smrti bunky (Pristov and Ghannoum 2019). Rezistencia voči azolovým derivátom je známa a doposiaľ boli popísané tri základné mechanizmy, vďaka ktorým *Candida spp*. odoláva účinku týchto antifungálnych látok:

1) Prvý mechanizmus zahŕňa indukciu efluxných púmp, ktoré sú u *Candida spp*. kódované génmi *CDR* a *MDR*. Zvýšená expresia génov *CDR* a *MDR* zapríčinila rezistenciu voči azolom u *C. albicans* (*CaMDR1*, *CaCDR1*, *CaCDR2*), *C. glabrata* (*CgCDR1*, *CgCDR2*) a *C. dubliniensis* (*CdMDR1*, *CdCDR1*) (Sanguinetti et al. 2015).
2) Alterácia alebo zvýšená expresia génu *ERG11*, ktorý kóduje cieľový enzým lanosterol 14-*α*-demetylázu predstavuje ďalší mechanizmus rezistencie voči azolom. Ukázalo sa, že mutácie v *ERG11* zabraňujú väzbe azolov na enzymatické miesto (Campoy and Adrio 2017).
3) Vytvorenie alternatívnej dráhy dôsledkom mutácií v géne *ERG3* zabraňuje tvorbe 14-*α*-metyl-3,6-diolu z 14-α-metylfekosterolu počas biosyntézy ergosterolu. Nahradenie ergosterolu 14-α-metylfekosterolom vedie k tvorbe funkčných bunkových membrán

húb, ktoré napomáhajú bunke udržovať jej prirodzenú funkciu a negujú účinok azolov (Pristov and Ghannoum 2019).

Je veľmi dôležité spomenúť, že *C. glabrata* je charakteristická tzv. *„získanou rezistenciou“*, kdežto *C. krusei* tzv. *„vrodenou rezistenciou“* voči flukonazolu (Arendrup and Patterson 2017). V prípade identifikácie týchto dvoch kandíd ako pôvodcu infekcie je nevyhnutné zvážiť, ktorá antifungálna látka sa použije pri terapii pacientov.

***Allylamíny*** sú antifungálne látky, ktoré blokujú biosyntézu ergosterolu húb. Hlavnými zástupcami tejto skupiny je terbinafín a nafitín, ktorí prejavili fungicídnu aktivitu proti vláknitým hubám a dermatofytom. Fungistaticky pôsobia proti *Candida spp*. (Nivoix et al. 2020). Terbinafín je aktívny proti infekciám spôsobených druhmi *Aspergillus spp*. a *Fusarium spp*., kdežto naftitín je účinný proti *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum* (Lipner and Scher 2019).

Mechanizmus účinku allylamínov spočíva v inhibícii enzýmu skvalén epoxidázy, ktorý katalyzuje konverziu tohto enzýmu na 2,3-skvalén epoxid. Inhibícia tejto enzymatickej aktivity vedie k akumulácii skvalénu, ktorý zvyšuje priepustnosť membrán čo má za následok usmrtenie bunky (Bhattacharya et al. 2020).

***Polyény*** sú fungicídne makrocyklické organické molekuly známe ako makrolidy. Najznámejším zástupcom tejto skupiny je amfotericín B, ktorý má v porovnaní s inými antimykotikami široké spektrum účinku. Je účinný proti väčšine kvasiniek a vláknitým hubám. Amfotericín B sa odporúča na liečbu infekcií spôsobených druhmi *Candida spp*., *Aspergillus spp*., *Fusarium spp*., *Mucor spp*., *Scedosporium spp*. a *Cryptococcus spp*. (Laniado-Laborín and Cabrales-Vargas 2009). Polyény majú miernu afinitu k cholesterolu čo má za následok ich toxicitu a množstvo vedľajších účinkov (Lemke et al. 2005). Vzhľadom na nefrotoxicitu amfotericínu B, boli pripravené lipidové formulácie, ktoré sa odlišujú z hľadiska farmakokinetiky, distribúciou v tkanivách a toxicitou. Lipozomálny amfotericín B (L-AmB) je prvotnou látkou pri terapii diseminovanej kandidózy. Táto formulácia sa taktiež osvedčila pri terapii infekcií asociovaných s biofilmom (Adler-Moore et al. 2016). Okrem L-AmB existuje i koloidná disperzia amfotericínu B (ABCD) (Botero Aguirre and Restrepo Hamid 2015). Ďalším zástupcom skupiny polyénov je nystatín, ktorý bol izolovaný v roku 1950 z fermentačného média *Streptomyces noursei*. Existuje v troch liekových formuláciách a v súčasnosti sa používa ako lokálne antimykotikum proti vaginálnej a orofaryngeálnej kandidóze (Lyu et al. 2016).

Hlavný mechanizmus účinku polyénov spočíva vo viazaní liečiva na ergosterol následkom čoho vznikajú transmembránové póry v plazmatickej membráne. Vznikom pórov prichádza k úniku

monovalentných iónov z bunky čo vedie k destabilizácii a následnej smrti (Bhattacharya et al. 2020).

***5-fluórcytozín*** je hlavným zástupcom antifungálnych látok patriacich do skupiny analógov pyrimidínu. Tieto liečivá preukázali fungicídnu aktivitu proti *Candida spp.* (Yu et al. 2020), *Cryptococcus spp*. (Stott et al. 2021) a *Aspergillus spp*. (Vahedi-Shahandashti and Lass-Flörl 2020). 5-fluórcytozín sa aplikuje pri mykotických infekciách spôsobených multirezistentnou kvasinkou *C. auris* (Frías-De-León et al. 2020) a pri opakujúcich sa infekciách močového mechúra zapríčinených rezistentnou *C. glabrata* (Kauffman et al. 2011). Inhibícia syntézy DNA, RNA i proteínov predstavuje hlavný mechanizmus účinku analógov pyrimidínu. Z dôvodu častej rezistencie klinických izolátov voči 5-fluórcytozínu sa toto liečivo zvyčajne používa v kombinácii s inou antifungálnou látkou (Wall and Lopez-Ribot 2020).

***Echinokandíny*** (mikafungín, kaspofungín a anidulafungín) sú najnovšou skupinou fungicídnych antifungálnych látok, ktoré sa indikujú pri terapii fungálnych infekcií a v profylaxii. Základ štruktúry echinokandínov tvorí cyklický hexapeptid s rôznymi postrannými reťazcami, ktoré sú zodpovedné za antifungálnu aktivitu (Eschenauer et al. 2007). Mikafungín, kaspofungín a anidulafungín vykazujú *in vitro* i *in vivo* fungicídnu aktivitu proti mnohým druhom rodu *Candida* (Chen et al. 2011). Taktiež sú účinné proti rezistentným klinickým izolátom *Candida spp*. (Pristov and Ghannoum 2019). Fungistaticky pôsobia proti *Aspergillus spp.* (Campoy and Adrio 2017). Toxicita echinokandínov je v porovnaní s amfotericínom B a analógmi pyrimidínu veľmi nízka kvôli ich jedinečnému cieľu, ktorý absentuje v bunkách cicavcov. Nevýhodou týchto terapeutík je fakt, že neexistujú v perorálnej forme a musia sa podávať intravenózne jedenkrát denne (Patil and Majumdar 2017).

Hlavný mechanizmus účinku spočíva v interferencii echinokandínov so syntézou glukánov v bunkovej stene húb. Echinokandíny inhibujú syntézu $\beta$-(1,3) D-glukánu (dôležitý polysacharid bunkovej steny) nekompetitívnou inhibíciou enzýmu $\beta$-(1,3) D-glukánsyntázy, čo zapríčiňuje osmotickú lýzu a následnú smrť buniek (Hüttel 2021). Rezistencia voči kaspofungínu bola popísaná u klinických izolátov kandíd získaných od imunokompromitovaných pacientov, ktorí boli vystavení dlhodobému pôsobeniu tohto liečiva. Je známe, že mutácie v génoch *C. albicans FKS1 a FKS2*, označované ako „*hot spot regions*“, vedú k substitúcii serínu 645 za prolín, fenylalanín a tyrozín, čo vedie k zmene cieľového miesta echinokandínov a následnej rezistencii buniek voči týmto antimykotikám (Lee et al. 2018).

## B. Protokol č. 1: Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) antifungálnych látok mikrodilučnou metódou

Stanovenie MIC antifungálnych látok bolo prevedené podľa Inštitútu pre klinické a laboratórne štandardy (CLSI document M27, 4th edition.2017).

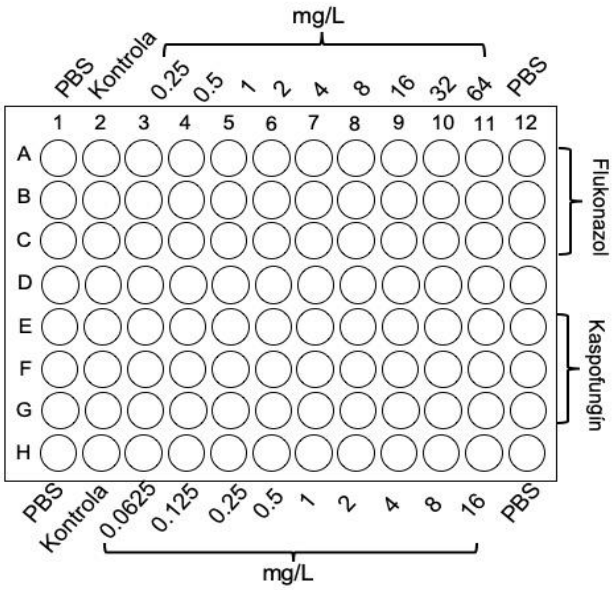
**Pomôcky**

- *C. albicans* SC5314
- *C. glabrata* ATCC2001
- 96 – jamková platnička s okrúhlym dnom (tzv. U – bottom)
- 1 x PBS
- Sterilná destilovaná voda
- YPD médium
- YPD agarové platne
- RPMI 1640 – MOPS médium
- Flukonazol zásobný roztok (50 mg/ml)
- Kaspofungín zásobný roztok (25 mg/ml)
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Plastové kyvety na meranie OD
- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Multikanálová pipeta (pre objem od 2 µl – 10 µl a pre objem od 50 µl – 200 µl)
- Vortex
- Spektrofotometer (na meranie OD)
- Centrifúga
- Termostat

**Pracovný postup**

1) Z čerstvej kultúry *C. albicans* SC5314 a *C. glabrata* ATCC2001 narastenej na YPD platni prenesieme jedno očko do 3 ml tekutého YPD média v skúmavke.
2) Inkubujeme za stáleho trepania (200 rpm) pri 30 °C cez noc.

3) Kvasinky z celonočnej kultúry prenesieme do Eppendorf skúmavky (2 ml) a centrifugujeme (5 000 rpm) pri izbovej teplote.
4) Supernatant vylejeme do zbernej nádoby a pelet rozpustíme v 2 ml 1 x PBS a opäť premyjeme.
5) Bunky riedime 1:100 a spektrofotometricky stanovíme koncentráciu buniek pri optickej denzite 600 nm ($OD_{600}$).
6) Následne kvasinky riedime na $OD_{600}$ 0.2 v 1 x PBS.
7) Z takto pripravenej suspenzie kvasiniek prenesieme 3 µl *C. albicans* do 997 µl vopred zohriateho RPMI1640 – MOPS média. V prípade *C. glabrata* 1.5 µl suspenzie kvasiniek prenesieme do 998.5 µl RPMI1640 – MOPS.
8) Do každej jamky pipetujeme 180 µl suspenzie kvasiniek ako je znázornené na obrázku č. 4.




**Obrázok č. 4.** Schématické znázornenie prípravy 96 – jamkovej mikrotitračnej platničky pre stanovenie citlivosti mikrodilučnou metódou.

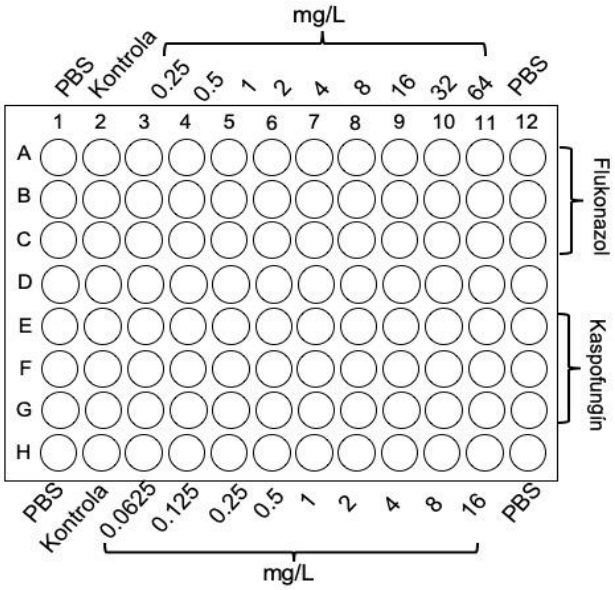
9) Pripravíme zásobné roztoky flukonazolu a kaspofungínu (10 x koncentrované) a do každej jamky pridáme 20 µl liečiva aby výsledná koncentrácia liečiva v jamke bola:
   Flukonazol: 0.25 mg/L – 0.5 mg/L – 1 mg/L – 2 mg/L – 4 mg/L – 8 mg/L – 16 mg/L – 32 mg/L – 64 mg/L.
   Kaspofungín: 0.0625 mg/L – 0.125 mg/L – 0.25 mg/L – 0.5 mg/L – 1 mg/L – 2 mg/L – 4 mg/L – 8 mg/L – 16 mg/L.
   Do jamiek slúžiacich ako kontrola pipetujeme 20 µl čistého RPMI1640 – MOPS. Do krajných jamiek pipetujeme 200 µl 1 x PBS aby sme zabránili odparovaniu média.

10) Takto pripravené mikrotitračné platničky inkubujeme pri teplote 37 °C, 24 h.

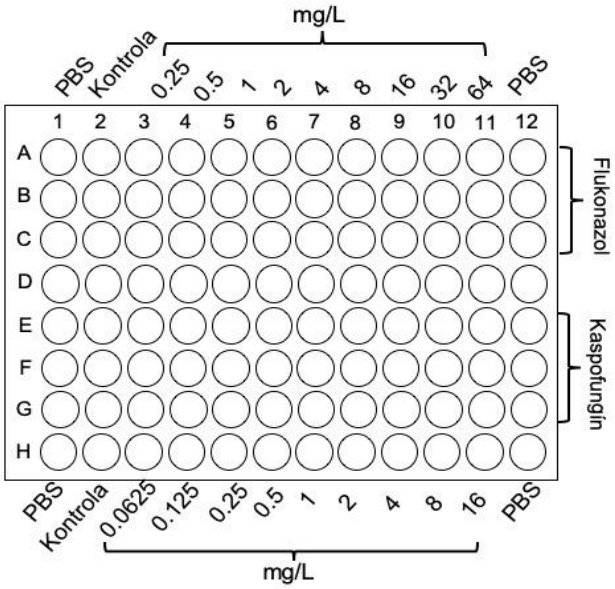
**Vyhodnotenie**

V jednotlivých jamkách farebne vyznačte políčka v ktorých ste schopní vizuálne detegovať rast buniek. Ako hodnotu $MIC_{50}$, teda koncentráciu antifungálnej látky, ktorá inhibuje nárast kvasiniek na 50% označíme jamku v ktorej nie je možné vizuálne určiť rast buniek. Hodnoty zapíšte do protokolu.

***C. albicans* SC5314**




***C. glabrata* ATCC2001**




**Poznámky**

.....

.....

.....

.....

.....

## C. Protokol č. 2: Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) antifungálnych látok pomocou Etestu

**Pomôcky**

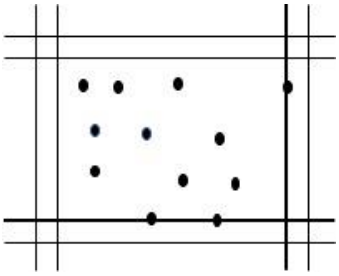
- *C. albicans* SC5314
- *C. glabrata* ATCC2001

- Etest stripy napustené flukonazolom (bioMérieux SA, Francúzsko)
- Etest stripy napustené vorikonazolom (bioMérieux SA, Francúzsko)
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Sterilné vatové tampóny
- Sterilný fyziologický roztok (0,9%)
- Sabouraud dextrose agar
- YPD médium
- RPMI 1640 – MOPS médium
- RPMI 1640 – MOPS agarové platne
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Pinzeta
- Bürkerova komôrka
- Vortex
- Centrifúga
- Termostat
- Svetelný mikroskop

**Pracovný postup**

1) Z čerstvej kultúry *C. albicans* SC5314 a *C. glabrata* ATCC2001 narastenej na Sabouraudovej agarovej platni prenesieme jedno očko do 3 ml tekutého YPD média v skúmavke.
2) Inkubujeme za stáleho trepania (200 rpm) pri 30 °C cez noc.
3) Kvasinky z celonočnej kultúry prenesieme do Eppendorf skúmavky (2 ml) a centrifugujeme (5 000 rpm) pri izbovej teplote.
4) Supernatant vylejeme do zbernej nádoby a pelet rozpustíme v 2 ml fyziologického roztoku a opäť premyjeme.
5) Bunky zriedime 1:1000 a stanovíme presný počet buniek v 1 ml pomocou Bürkerovej komôrky (obrázok č. 5). Vždy rátame počet buniek minimálne v dvanástich malých políčkach. Finálny počet buniek v 1 ml vypočítame nasledovnou rovnicou:

**„priemer počtu buniek x 25 x $10^4$ x faktor riedenia“**

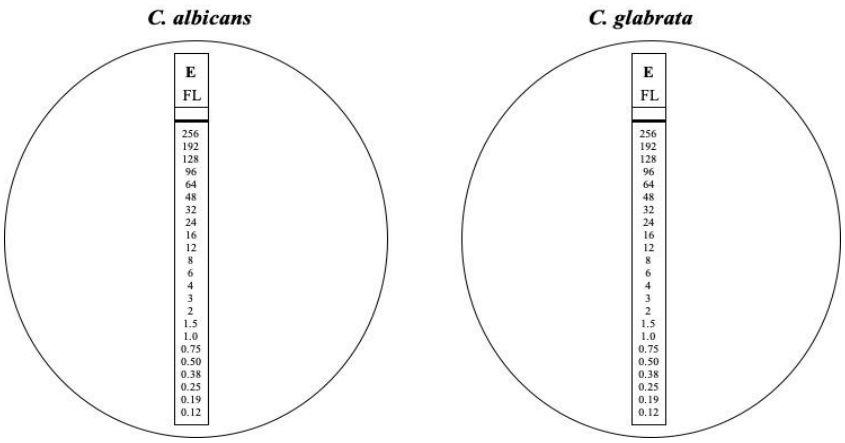


**Obrázok č. 5.** Zobrazený je jeden malý štvorec Bürkerovej komôrky. Počítame počet buniek vo vnútri políčka a v dvoch priľahlých stenách daného štvorca. Vždy rátame počet buniek minimálne v dvanástich malých políčkach Bürkerovej komôrky. Následne pomocou rovnice „priemer počtu buniek x 25 x $10^4$ x faktor riedenia“ dostaneme konečný počet buniek v 1 ml.

6) Následne si pripravíme suspenziu *C. albicans* a *C. glabrata* buniek v RPMI 1640 – MOPS médiu s konečnou koncentráciou 1 x $10^6$ buniek/ml.
7) Z chladničky vyberieme RPMI 1640 – MOPS agarové misky a necháme ich stáť pri izbovej teplote približne 30 min.
8) Namočíme sterilný tampón do suspenzie buniek a odstránime prebytočné množstvo roztoku jemným pritlačením tampónu na vnútorné steny Eppendorf skúmavky.
9) Tampónom jemne rozotrieme bunky po povrchu agarovej misky. Misku vždy otočte o 60 stupňov aby prišlo k rovnomernému rozotretiu inokula.
10) Opäť namočíme ten istý tampón do inokula, rozotrieme po povrchu misky a necháme zaschnúť približne 15 – 20 min. Povrch misky musí byť úplne suchý predtým ako sa naň aplikuje strip Etestu.
11) Pomocou sterilnej pinzety vyberieme strip z obalu.
12) Aseptickým spôsobom priložíme na povrch agarovej platne a so stripom už nehýbeme. Pomocou sterilnej pinzety veľmi jemne pritlačíme povrch stripu aby celá časť E-testu bola v kontakte s agarom.
13) Misky inkubujeme pri teplote 37 °C, 48 h.

**Vyhodnotenie**

Na agarových miskách vyznačte nárast buniek a inhibičnú zónu. Detegujte presne, ktorá koncentrácia antimykotika inhibuje nárast kvasiniek. Zapíšte do protokolu.




**Poznámky**

.....

.....

.....

.....

.....

## D. Protokol č. 3: Stanovenie Minimálnej fungicídnej koncentrácie (MFC)

**Pomôcky**

- Mikrotitračné platničky, ktoré boli použité pre stanovenie MIC u *C. albicans* SC5314 a *C. glabrata* ATCC2001 (experiment v sekcii 2 B)
- YPD agarové platne
- Multikanálová pipeta pre menšie objemy (od 2 µl – 10 µl)
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl)
- Termostat

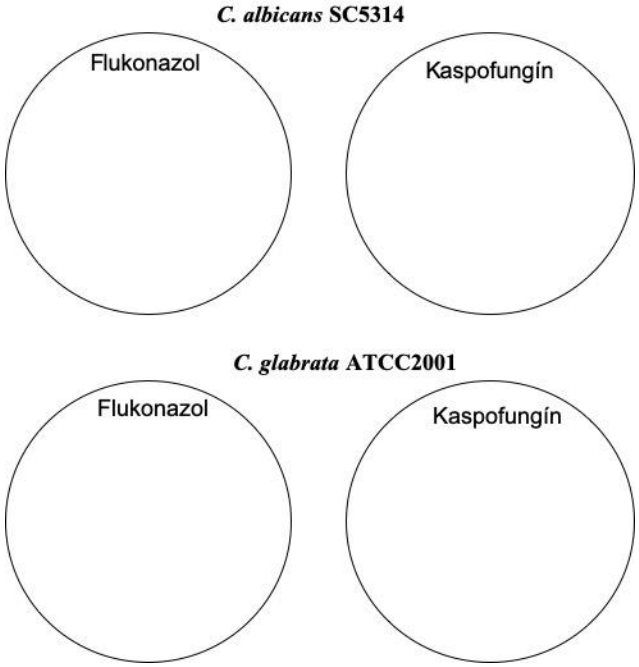
**Pracovný postup**

1) Obsah jamiek mikrotitračných platničiek, ktoré boli použité na stanovenie $MIC_{50}$ premiešame pomocou pipety.

2) Multikanálovou pipetou prenesieme 4 µl obsahu každej jamky na príslušné YPD agarové platne.
3) Misky inkubujeme pri teplote 37 °C, 48 h.

**Vyhodnotenie**

Na agarových miskách nakreslite rast buniek po 48 h inkubácii. Ako minimálna fungicídna koncentrácia sa označí koncentrácia antifungálnej látky, pri ktorej dochádza k inhibícii rastu *C. albicans* a *C. glabrata* na 99,9%. Výsledky zaznačte do protokolu.




**Poznámky**

.....

.....

.....

.....

.....

## E. Zoznam použitej literatúry

Adler-Moore JP, Gangneux JP, Pappas PG. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. Med Mycol. 2016;54(3):223–31.

Arendrup MC. Candida and Candidaemia: Susceptibility and Epidemiology. Dan Med J. 2013;60(11):1–32.

Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST)*. Clin Microbiol Infect. 2012 Jul;18(7):E246–7.

Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant candida: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. J Infect Dis. 2017;216(Suppl 3):S445–51.

Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. Antibiotics. 2020;9(6):1–19.

Botero Aguirre JP, Restrepo Hamid AM. Amphotericin B deoxycholate versus liposomal amphotericin B: effects on kidney function. Cochrane Database Syst Rev. 2015.

Campoy S, Adrio JL. Antifungals. Biochem Pharmacol. 2017;133:86–96.

Chen L, Krekels EHJ, Verweij PE, Buil JB, Knibbe CAJ, Brüggemann RJM. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Posaconazole. Drugs. 2020;80(7):671–95.

Chen SC-A, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections. Drugs. 2011 Jan;71(1):11–41.

Clark NM, Grim SA, Lynch JP. Posaconazole: Use in the Prophylaxis and Treatment of Fungal Infections. Semin Respir Crit Care Med. 2015;36(5):767–85.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guidelines – Second Edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

Ellsworth M, Ostrosky-Zeichner L. Isavuconazole: Mechanism of action, clinical efficacy, and resistance. J Fungi. 2020;6(4):1–10.

Eschenauer G, DePestel DD, Carver PL. Comparison of echinocandin antifungals. Ther Clin Risk Manag. 2007 Feb;3(1):71–97.

Etest® Antifungal Susceptibility Testing 9305056D - en - 2013/02. bioMèrieux SA, France. www.biomerieux.com

Frías-De-León MG, Hernández-Castro R, Vite-Garín T, Arenas R, Bonifaz A, Castañón-Olivares L, et al. Antifungal Resistance in Candida auris: Molecular Determinants.

Antibiotics. 2020 Sep 2;9(9):568.

Giamarellos-Bourboulis EJ, Stamou A, Maraki S, Solomonidi N, Belesiotou E, Pistiki A, et al. Susceptibility profiles and clinical efficacy of antifungals against candida bloodstream isolates from critically ill patients: Focus on intravenous itraconazole. Int J Antimicrob Agents. 2019;54(4):471–7.

Hüttel W. Echinocandins: structural diversity, biosynthesis, and development of antimycotics. Appl Microbiol Biotechnol. 2021;105(1):55–66.

Kauffman CA, Fisher JF, Sobel JD, Newman CA. Candida Urinary Tract Infections—Diagnosis. Clin Infect Dis. 2011 May 15;52(suppl_6):S452–6.

Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. Rev Iberoam Micol. 2009;26(4):223–7.

Lee KK, Kubo K, Abdelaziz JA, Cunningham I, de Silva Dantas A, Chen X, et al. Yeast species-specific, differential inhibition of β-1,3-glucan synthesis by poacic acid and caspofungin. Cell Surf. 2018 Sep;3:12–25.

Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. Appl Microbiol Biotechnol. 2005;68(2):151–62.

Lipner SR, Scher RK. Onychomycosis: Treatment and prevention of recurrence. J Am Acad Dermatol. 2019;80(4):853–67.

Lyu X, Zhao C, Hua H, Yan Z. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. Drug Des Devel Ther. 2016 Mar;1161.

National Committee on Clinical and Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. CLSI document M27-A2. 1997. Clinical and laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA.

Nivoix Y, Ledoux MP, Herbrecht R. Antifungal Therapy: New and Evolving Therapies. Semin Respir Crit Care Med. 2020;41(1):158–74.

Patil A, Majumdar S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. J Pharm Pharmacol. 2017 Nov 10;69(12):1635–60.

Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest Methods with the CLSI Broth Microdilution Method for Echinocandin Susceptibility Testing of Candida Species. J Clin Microbiol. 2010 May 1;48(5):1592–9.

Posteraro B, Sanguinetti M. The future of fungal susceptibility testing. Future Microbiol. 2014 Aug;9(8):947–67.

Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide.

Clin Microbiol Infect. 2019;25(7):792–8.

Rosanova MT, Bes D, Serrano Aguilar P, Sberna N, Lede R. Efficacy and safety of voriconazole in immunocompromised patients: systematic review and meta-analysis. Infect Dis (Auckl). 2018;50(7):489–94.

Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among Candida species: Mechanisms and clinical impact. Mycoses. 2015;58(S2):2–13.

Shukla PK, Singh P, Yadav RK, Pandey S, Bhunia SS. Past, Present, and Future of Antifungal Drug Development. In 2016. p. 125–67.

Stott KE, Loyse A, Jarvis JN, Alufandika M, Harrison TS, Mwandumba HC, et al. Cryptococcal meningoencephalitis: time for action. Lancet Infect Dis. 2021.

Vahedi-Shahandashti R, Lass-Flörl C. Novel Antifungal Agents and Their Activity against Aspergillus Species. J Fungi. 2020 Oct 9;6(4):213.

Wall G, Lopez-Ribot JL. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. Antibiotics. 2020;9(8):1–10.

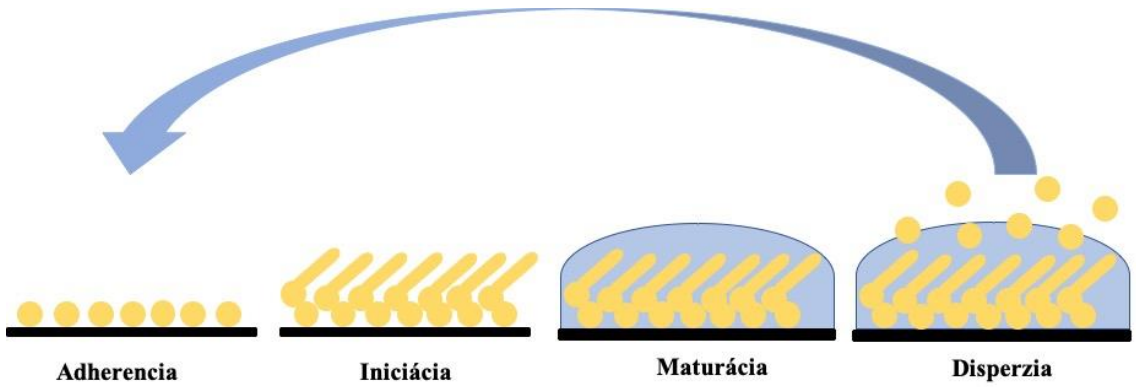
Yu Y, Albrecht K, Groll J, Beilhack A. Innovative therapies for invasive fungal infections in preclinical and clinical development. Expert Opin Investig Drugs. 2020 Sep 1;29(9):961–7

# ÚLOHA Č. 3: SCHOPNOSŤ ADHERENCIE A TVORBY BIOFILMU *CANDIDA SPP.*

## A. Teoretický úvod

Biofilmy predstavujú viacvrstvové štruktúry mikroorganizmov, ktoré sú ukotvené v extracelulárnom polymérnom materiáli nazývanom „*extracelulárna matrix*“ (Lohse et al. 2018). Nachádzajú sa všade okolo nás a typickým príkladom tejto štruktúry je dentálny plak, ktorý odstránime jednoducho mechanicky zubnou kefkou. Mikroorganizmy vytvárajú biofilmy z dôvodu ochrany pred vplyvmi vonkajšieho prostredia. Napriek tejto vlastnosti sú baktérie a kvasinky schopné kolonizovať povrchy medicínskych pomôcok, ako napríklad, centrálno-venózne, močové katétre, umelé srdcové chlopne, kardiostimulátory, bedrové implantáty. Osídlenie týchto povrchov vedie k ich dysfunkciu a následne vážnemu ohrozeniu života pacientov (Kumamoto 2002). Najčastejšími pôvodcami biofilmov sú baktérie rodu *Staphylococcus spp.* (Otto 2018) a kvasinky *Candida spp.* (Chandra and Mukherjee 2015).

Vytvorenie biofilmov sprevádza dynamický proces, ktorý sa formuje v nasledovných štádiách (obrázok č. 6):




**Obrázok č. 6.** Tvorba biofilmu *Candida albicans*.

- Adherencia – prvotná fáza, ktorú charakterizuje priľnutie kvasiniek na povrch substrátu (0 h – 11 h) (Tsui et al. 2016).
- Iniciácia tvorby biofilmu – toto štádium je spätá s periódou adherencie. Je charakteristické prítomnosťou kvasiniek, a počiatočným vytváraním výpučkov a pravých hýf. V tomto kroku sa tvoria základy extracelulárnej matrix (12 h – 30 h) (Tsui et al. 2016).

- Maturácia – v tejto fáze prichádza k zmohutneniu extracelulárnej matrix, v ktorej je ukotvená štruktúra biofilmu vytvorená z kvasiniek, pravých hýf a pseudohýf (14 h – 24 h) (Tsui et al. 2016).
- Disperzia – uvoľnenie buniek z biofilmu je typickým znakom tejto fázy. Rozptýlené bunky do okolitého prostredia majú unikátnu schopnosť adhézie a kolonizácie povrchu materiálov a tkanív (Wall et al. 2019).

Tvorba extracelulárnej matrix je charakteristickým prvkom biofilmov. Tento polymérny materiál poskytuje bunkám extrémnu ochranu pred vplyvom antifungálnych látok a dáva im schopnosť odolávať imunitnému systému hostiteľa. Extracelulárna matrix biofilmov *C. albicans* je zložená z 55 % proteínov, 25 % karbohydrátov, 15 % lipidov a 5% nukleových kyselín (Zarnowski et al. 2014).

Adherencia a tvorba biofilmu *Candida spp*. môže byť ovplyvnená viacerými faktormi. Typ substrátu, médium, pH, prítomnosť séra, zdroj uhlíka vplývajú na tento proces. Je preto veľmi dôležité brať tieto informácie do úvahy pri dizajne experimentov. Polystyrén, respektíve povrch 24 a 96 – jamkovej polystyrénovej platničky, predstavuje najobľúbenejší substrát pre tvorbu *Candida spp*. biofilmu v *in vitro* statických podmienkach. V tomto modeli sa adherencia deteguje za 90 min a tvorba biofilmu za 24 h alebo 48 h (Slettengren et al. 2020). Polystyrénové platničky sa s obľubou používajú i pri stanovení citlivosti biofilm-tvoriacich buniek na antifungálne látky. V týchto systémoch dokážeme testovať nielen viacero antimykotík naraz, ale i široké spektrum koncentrácií tej istej látky. 96 – jamkové polystyrénové platničky boli použité pri stanovení citlivosti *C. albicans* i *C. glabrata* buniek asociovaných s biofilmom na echinokandíny (Kucharíková et al. 2011). Taktiež sa využili pri sledovaní efektivity nových terapeutík (Bink et al. 2012; Holtappels et al. 2017). Polyuretán je dôležitý materiál pre manufaktúru medicínskych pomôcok, napríklad centrálno – venóznych katétrov. Práve tento substrát, respektíve 1 cm kúsky polyuretánu, boli použité pri detekcii *in vitro* aj *in vivo C. albicans* (Řičicová et al. 2010) i *C. glabrata* (Kucharíková et al. 2015) biofilmu. Tento materiál sa využil tiež pri stanovení citlivosti *C. albicans* biofilmov na echinokandíny *in vivo* (Kucharíková et al. 2010; Kucharíková et al. 2011). Je dôležité spomenúť, že inkubácia polyuretánových katétrov v sére (O/N pri 37 °C) viedla ku zvýšenej adherencii kandíd na povrch tohto substrátu (Řičicová et al. 2010). Okrem statických modelov tvorby biofilmu existujú i tzv. „*flow*“, alebo prietokové systémy, ktoré sú charakteristické konštantným prísunom čerstvého média a odvádzaním splodín metabolizmu.

Médium a jeho pH sú dôležitými zložkami, ktoré stimulujú adhéziu buniek k povrchu a tvorbe biofilmu. RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) je favorizovaným médiom pri tvorbe biofilmu *Candida spp*. Toto médium je veľmi bohaté nutrične a u *C. albicans* stimuluje prechod z kvasiniek do formy hýf, čo je jeden z najdôležitejších faktorov virulencie tejto kvasinky (Weerasekera et al. 2016). Navyše RPMI 1640 sa z hľadiska zastúpenia jednotlivých živín podobá ľudskej krvi. Úprava pH RPMI 1640 média na hodnotu 7.0 viedla k zvýšenej adherencii kandíd v porovnaní s tým istým médiom, ale pH upraveným na 5.6 (Kucharíková et al. 2011). Vo všeobecnosti, tieto fakty podporujú nevyhnutnosť správneho výberu jednotlivých podmienok vplývajúcich na tvorbu biofilmu.

Na kvantifikáciu biofilmu sa využívajú rôzne postupy, ktoré sú založené nielen na mikrobiologických, molekulárnych poznatkoch metód ale i na základe fyzikálnych a chemických vlastností buniek tvoriacich biofilm. Najjednoduchšiu metódu stanovenia množstva kvasiniek asociovaných s biofilmom v *in vitro* podmienkach predstavuje detekcia počtu tzv. „*colony forming unit counts*“ (CFU), teda stanovenie počtu kolónie tvoriacich jednotiek (Tawakoli et al. 2013). Stanovenie počtu buniek tvoriacich biofilm touto metódou je však možné iba v prvotných štádiách tvorby biofilmu (perióda adherencie). V neskorších fázach je nevyhnutné štruktúry biofilmov sonikovať aby nastalo rozrušenie spleti buniek. Navyše, *C. albicans* biofilmy sú známe prítomnosťou hýf a pseudohýf, ktoré treba porušiť kvôli správnemu výsevu na platniach a následnému správnemu odčítaniu počtu buniek.

Ďalšou technikou detekcie tvorby *Candida spp.* biofilmu je metóda založená na farbení biofilm-tvoriacich buniek kryštálovou violeťou (Jin et al. 2003). Ide o najčastejšie používanú a finančne dostupnú biochemickú metódu stanovenia *in vitro* biofilmu v 96 – jamkových polystyrénových platničkách (Christensen et al. 1985). Pri tomto postupe prichádza k detekcii kompletnej biomasy biofilmov vrátane živých, mŕtvych buniek a niektorých zložiek extracelulárnej matrix. Pri použití tejto metódy sú bunky najskôr fixované etanolom a následne rozpustené v roztoku kyseliny octovej. Sfarbenie sa meria spektrofotometricky pri 595 nm.

Medzi autormi sú obľúbené tzv. kolorimetrické metódy detekcie biofilmu, ktoré sú relatívne jednoduché a rýchle. Výsledky sa dajú spektrofotometricky odčítať do niekoľkých hodín. Príkladom je XTT redukčná metóda, ktorej princíp spočíva v redukcii substrátu XTT tetrazoliovej soli (2,3-bis-(2-metoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid), na vo vode rozpustný formazan (oranžové sfarbenie) mitochondriálnymi dehydrogenázami metabolicky aktívnych buniek (Scudiero et al. 1988). Farebná zmena sa meria spektrofotometrom pri 490 nm. XTT metóda sa zvyčajne používa ako indikátor životaschopnosti buniek, rastu a cytotoxicity.

Mikroskopické techniky hrajú veľmi dôležitú úlohu najmä pri detekcii štruktúry biofilmov. Napríklad, skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM – Scanning Electron Microscopy) sa používa na sledovanie architektúry povrchu biofilmu a taktiež morfológie buniek asociovaných s biofilmom (Chesnokova et al. 2019). Konfokálna skenovacia laserová mikroskopia (CSLM – Confocal Scanning Electron Microscopy) poskytuje informácie o zložení biofilmu a morfológii buniek v tzv. „*trojrozmernom (3D)*“ rozlíšení. Konfokálny mikroskop stanovuje parametre ako veľkosť biofilmu, jeho hrúbku a drsnosť (Kania et al. 2010).

Odolnosť buniek tvoriaciach biofilm voči bežne dostupným antifungálnym látkam je vo všeobecnosti známa. *C. albicans* biofilmy sú rezistentné voči azolovým derivátom, vrátane flukonazolu, ketokonazolu, itrakonazolu a vorikonazolu (Gao et al. 2018). Navyše, tieto biofilmy preukázali zníženú citlivosť na amfotericín B (Nailis et al. 2010) a flucytozín (Nett et al. 2010). Echinokandíny (mikafungín, kaspofungín a anidulafungín) a amfotericín B (lipidová forma) sú najaktívnejšie dostupné antimykotiká, ktoré dokážu eliminovať už vytvorené *C. albicans* biofilmy. Všetky tri echinokandíny boli účinné pri terapii *C. albicans* biofilmov vytvorených v experimentálnom subkutánnom modeli tvorby biofilmu *in vivo* (Kucharíková et al. 2013). Kaspofungín sa taktiež preukázal aktívny pri terapii *C. glabrata* biofilm asociovaných buniek v *in vitro* aj v *in vivo* podmienkach (Kucharíková et al. 2015).

## B. Protokol č. 1: Sledovanie adherencie a tvorby biofilmov v jamkách 96-jamkovej mikrotitračnej platničky

**Pomôcky**

- *C. albicans* SC5314
- *C. glabrata* ATCC2001
- 96 – jamková platnička s plochým dnom (tzv. flat – bottom)
- 1 x PBS
- Sterilná destilovaná voda
- YPD médium
- YPD platne
- RPMI 1640 – MOPS médium
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)

- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Bürkerova komôrka
- Vortex
- Centrifúga
- Termostat
- Svetelný mikroskop

**Pracovný postup**

1) Niekoľko kolónií kvasiniek narastených na YPD platni (24 h) prenesieme do Eppendorf skúmavky (2 ml) a centrifugujeme (5 000 rpm) pri izbovej teplote.
2) Supernatant vylejeme do zbernej nádoby a pelet rozpustíme v 2 ml 1 x PBS a opäť premyjeme. Tento krok opakujeme dvakrát.
3) Bunky zriedime 1:1000 a stanovíme presný počet buniek v 1 ml pomocou Bürkerovej komôrky ako je uvedené na obrázku č. 5.
4) Následne si pripravíme suspenziu *C. albicans* a *C. glabrata* buniek v RPMI 1640 – MOPS médiu (zohriate na izbovú teplotu) s konečnou koncentráciou 1 x $10^7$ buniek/ml.
5) Do jamiek pipetujeme 100 µl suspenzie kvasiniek v troch paralelkách.
6) Takto pripravenú platničku inkubujeme pri 37 °C, 90 min, staticky (perióda adherencie).
7) Jednotlivé jamky premyjeme pomocou 1 x PBS (200 µl). Tento krok opakujeme dvakrát.
8) Do každej jamky pridáme sterilné, na izbovú teplotu zohriate RPMI 1640 – MOPS médium.
9) Do okolitých jamiek pipetujeme sterilnú destilovanú vodu (200 µl). Tento krok zabráni evaporácii média zo študovaných jamiek.
10) Platničku inkubujeme pri 37 °C, 24 h, staticky (perióda tvorby biofilmu).
11) Následne všetky jamky premyjeme pomocou 1 x PBS (200 µl). Tento krok opakujeme dvakrát. Taktiež odstránime prebytočnú vodu z okolitých jamiek.
12) Tvorbu biofilmu kvantifikujeme pomocou metódy XTT alebo kryštálovou violeťou.

**C. Protokol č. 2: Detekcia tvorby biofilmu XTT metódou**

**Pomôcky**

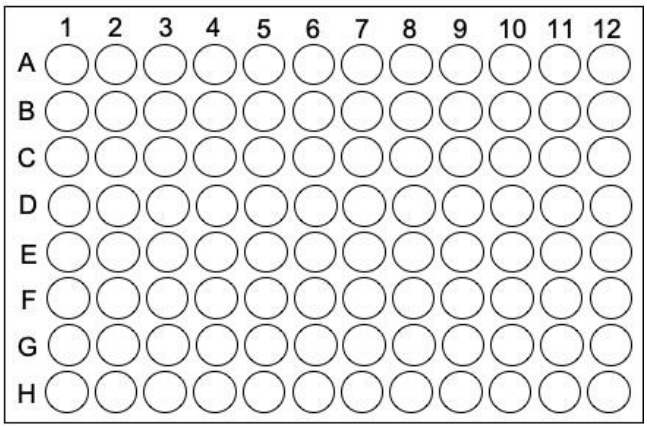
- 96 – jamková platnička, ktorá obsahuje adherované bunky, alebo bunky tvoriace biofilm
- 1 x PBS
- Sterilná destilovaná voda
- XTT sódium hydrát kyseliny 3´-[1- (fenylaminokarbonyl)- 3,4- tetrazolium]-bis (4-metoxy-6-nitro) benzensulfónovej) – zásobný roztok (10 mg/ml) pripravený v sterilnom roztoku 1 x PBS
- Menadión – zásobný roztok (1 M) pripravený v sterilnej destilovanej vode
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Vortex
- Termostat
- Spektrofotometer (ELISA reader)

**Pracovný postup**

1) Všetky roztoky musia byť pripravené priamo pred cvičením a musia byť uskladnené v tme v dôsledku citlivosti chemikálií na svetlo.
2) Pripravíme pracovný roztok XTT (1 mg/ml) v sterilnom roztoku 1 x PBS.
3) Do takto pripraveného roztoku XTT pridáme menadión (XTT/menadión) aby jeho výsledná koncentrácia bola 1 µM.
4) Do premytých jamiek, ktoré obsahujú adherované bunky, alebo bunky tvoriace biofilm pipetujeme 100 µl roztoku XTT/menadión.
5) V prípade kontroly (blank) pipetujeme 100 µl roztoku XTT/menadión do čistej jamky.
6) Inkubácia platničky v inkubátore pri 37 °C, 1 – 3 hod v tme.
7) Po redukcii XTT soli na XTT formazan mitochondriálnymi dehydrogenázami sa farebná zmena zo žltej na oranžovú meria spektrofotometricky pri 490 nm.

**Vyhodnotenie**

Na mikrotitračnej platničke farebne vyznačte schopnosť adherencie a tvorbu biofilmu *C. albicans* a *C. glabrata*. Do tabuľky uveďte hodnoty namerané spektrofotometrom po perióde adherencie (90 min) a tvorby biofilmu (24 h) a vypočítajte priemer ± SD. Vyhodnoťte graficky a výsledky zapíšte do protokolu.




| **Kmeň** | ***C. albicans*** | | ***C. glabrata*** | |
|---|---|---|---|---|
| | ***Adherencia*** | ***Biofilm*** | ***Adherencia*** | ***Biofilm*** |
| Hodnota ($OD_{490}$) | | | | |
| Hodnota ($OD_{490}$) | | | | |
| Hodnota ($OD_{490}$) | | | | |
| **Priemer ± SD** | | | | |

OD – optická denzita
SD – smerodajná odchýlka

**Poznámky**

.....

.....

.....

.....

.....

## D. Protokol č. 3: Stanovenie tvorby biofilmu kryštálovou violeťou

**Pomôcky**

- 96 – jamková platnička, ktorá obsahuje adherované bunky, alebo bunky tvoriace biofilm
- 1 x PBS
- Sterilná destilovaná voda

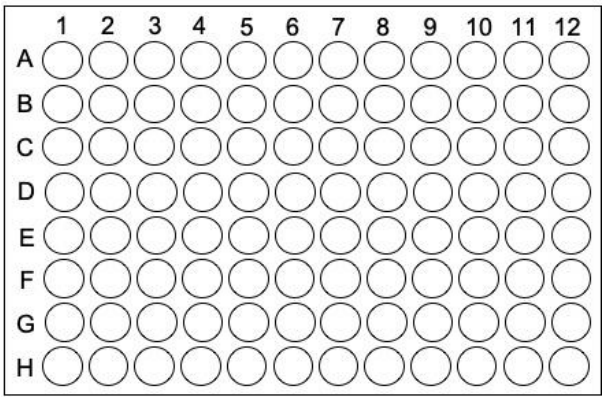
- Kryštálová violeť – 1 % roztok pripravený v sterilnej destilovanej vode
- Kyselina octová – 30 % roztok pripravený v sterilnej destilovanej vode
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Vortex
- Spektrofotometer (ELISA reader)

**Pracovný postup**

1) Premyté jamky obsahujúce adherované bunky a bunky tvoriace biofilm necháme vysušiť pri izbovej teplote 30-45 min.
2) Do každej jamky pipetujeme 200 µl 1% kryštálovej violete a necháme pôsobiť 45 min pri izbovej teplote.
3) Následne každú jamku premyjeme destilovanou vodou (200 µl) a necháme vysušiť pri izbovej teplote 30-45 min.
4) Odfarbíme pridaním 30 % kyseliny octovej a premiešame pipetovaním.
5) Množstvo kryštálovej violete v roztoku meriame spektrofotometrom pri 595 nm.

**Vyhodnotenie**

Na mikrotitračnej platničke farebne vyznačte tvorbu biofilmu *C. albicans* a *C. glabrata*. Do tabuľky uveďte hodnoty namerané spektrofotometrom a vypočítajte priemer ± SD. Vyhodnoťte graficky a výsledky uveďte do protokolu.




| **Kmeň** | ***C. albicans*** | | ***C. glabrata*** | |
|---|---|---|---|---|
| | ***Adherencia*** | ***Biofilm*** | ***Adherencia*** | ***Biofilm*** |
| Hodnota ($OD_{595}$) | | | | |
| Hodnota ($OD_{595}$) | | | | |
| Hodnota ($OD_{595}$) | | | | |
| **Priemer ± SD** | | | | |

OD – optická denzita
SD – smerodajná odchýlka

**Poznámky**

.....

.....

.....

.....

.....

## E. Protokol č. 4: Príprava biofilmov v polyuretánových katétroch

**Pomôcky**

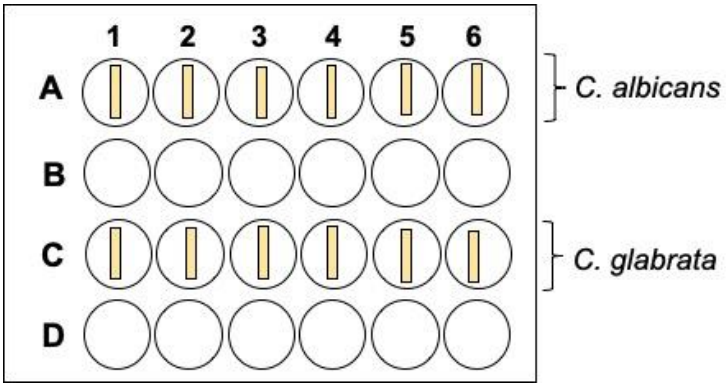
- *C. albicans* SC5314
- *C. glabrata* ATCC2001
- 24 – jamková platnička s plochým dnom

- Polyuretánový katéter, ktorý je súčasťou centrálneho venózneho katétra (Multi-Lumen Central Venous Catheterization Set with Blue FlexTip® Catheter, CV-15703, Arrow International Reading, USA)
- Fetálne bovínne sérum (99 %)
- 1 x PBS
- Sterilná destilovaná voda
- YPD médium
- RPMI1640 – MOPS médium
- Etanol (96 %)
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Skalpel
- Pinzeta
- Pravítko
- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Bürkerova komôrka
- Vortex
- Termostat
- Svetelný mikroskop
- Nádoba s ľadom

**Pracovný postup**

1) 24 h pred experimentom pripravíme 1 cm kúsky polyuretánových katétrov. Veľkosť jednotlivých kúskov by mala byť rovnaká.
2) Maximálne 15 polyuretánových kúskov vložíme do Eppendorf skúmavky (2 ml).
3) Pridáme fetálne bovínne sérum a skúmavku jemne vortexujeme aby prišlo k distribúcii séra do jednotlivých lúmenov. Pridáme ešte pár kvapiek séra aby katétre boli ponorené v roztoku.
4) Katétre inkubujeme pri 37 °C, O/N, staticky.
5) Kvasinky narastené na čerstvej YPD platni (24 h) prenesieme do Eppendorf skúmavky (2 ml) a centrifugujeme (5 000 rpm) pri izbovej teplote.

6) Supernatant vylejeme do zbernej nádoby a pelet rozpustíme v 2 ml 1 x PBS a opäť premyjeme. Tento krok opakujeme dvakrát.
7) Bunky riedime 1:1000 a stanovíme presný počet buniek v 1 ml pomocou Bürkerovej komôrky ako je uvedené na obrázku č. 5.
8) Následne si pripravíme suspenziu *C. albicans* (5 x $10^4$ buniek/ml) a *C. glabrata* (1 x $10^6$ buniek/ml v RPMI 1640 – MOPS médiu (zohriate na izbovú teplotu).
9) Sérom pokryté katétre prenesieme do jednotlivých jamiek 24 jamkovej polystyrénovej platničky ako je znázornené na obrázku č. 7. Vždy skontrolujeme čírosť séra. Zakalené sérum znamená kontamináciu.




**Obrázok č. 7.** Príprava 24 – jamkovej polystyrénovej platničky pre tvorbu biofilmu v polyuretánovývh katétroch. Žlté prúžky reprezentujú jednotlivé katétre.

10) Pred pridaním suspenzie kvasiniek odstránime prebytočné sérum z okolia katétrov v jednotlivých jamkách.
11) Do jamiek pipetujeme 1 ml suspenzie kvasiniek v šiestich paralelkách.
12) Ak jednotlivé katétre vyplávajú na povrch jemne ich zatlačíme sterilnou špičkou na dno jamiek.
13) Takto pripravenú platničku inkubujeme pri 37 °C, 90 min, staticky (perióda adherencie).
14) Následne aspiráciou odstránime okolité médium.
15) Jednotlivé katétre premyjeme pomocou 1 x PBS (1 ml). Katétre uchopíme kolmo do sterilnej pinzety a kvapkáme PBS priamo na jednotlivé lúmeny. Prúd PBS má byť dostatočne jemný aby neprišlo k odplaveniu adherovaných buniek. Tento krok opakujeme dvakrát.
16) Premyté katétre prenesieme do jamiek novej 24 jamkovej polystyrénovej platničky. Prebytočné 1 x PBS odstránime jemnou aspiráciou z okolia katétrov.
17) Do každej jamky pridáme 1 ml RPMI 1640 – MOPS média (zohriate na izbovú teplotu)

18) Opäť jemne zatlačíme jednotlivé katétre na dno jamiek.
19) Platničku inkubujeme pri 37 °C, 24 h, staticky (perióda tvorby biofilmu).
20) Následne všetky katétre premyjeme pomocou 1 x PBS (1 ml) ako je uvedené v kroku č. 14.
21) Každý premytý katéter vložíme do vopred pripravenej Eppendorf skúmavky, ktorá obsahuje 1 ml 1 x PBS.
22) Eppendorf skúmavky, ktoré obsahujú katéter okamžite vložíme do ľadu (zastavenie všetkých biologických procesov).
23) Tvorbu biofilmu kvantifikujeme pomocou metódy kolónie tvoriacich buniek.

## F. Protokol č. 5: Stanovenie tvorby biofilmu na základe kolónie tvoriacich jednotiek (colony forming units – CFU)

**Pomôcky**

- Eppendorf skúmavky s premytými katétrami (uvedené vyššie)
- 1 x PBS
- YPD platne
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml)
- Pinzeta
- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Termostat
- Vortex
- Ultrazvukový kúpeľný sonikátor
- Nádoba s ľadom

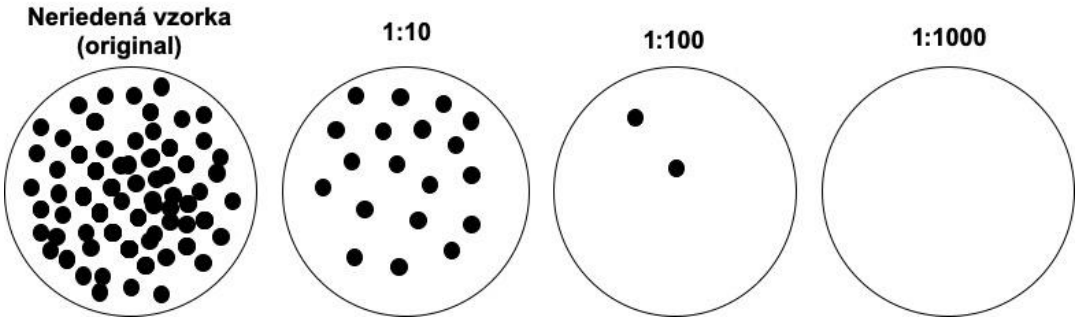
**Pracovný postup**

1) Eppendorf skúmavky s premytými katétrami pripravené v predošlom bode sonikujeme 10 min vo vodnom kúpeli pri 40 000 Hz.
2) Vzorky vložíme do ľadu.
3) Každú Eppendorf skúmavku vortexujeme 30 s pri vysokých otáčkach a okamžite vložíme do ľadu.

4) Pripravíme Eppendorf skúmavky s desiatkovým riedením (1:10, 1:100 a 1:1000).
5) Riedené vzorky (100 µl) prenesieme na vopred pripravené YPD platne. Každé riedenie vysievame na dve paralelné YPD platne.
6) YPD platne inkubujeme pri 37 °C, 48 h.

## Vyhodnotenie

Jednotlivé kolónie spočítame a výsledné hodnoty uvedieme do tabuľky a prepočítame spolu s použitým riedením. Znázorníme graficky ako $\log_{10}$ buniek pomocou GraphPad PRISM software.




| **Vzorka *C. albicans*** | **Originál** | | **1:10** | | **1:100** | | **1:1000** | | **Počet buniek** | **Počet buniek v 1 ml** | **$Log_{10}$** | **Priemer** | **SD** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Katéter 1 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 2 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 3 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 4 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 5 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 6 | | | | | | | | | | | | | |

| **Vzorka *C. glabrata*** | **Originál** | | **1:10** | | **1:100** | | **1:1000** | | **Počet buniek** | **Počet buniek v 1 ml** | **$Log_{10}$** | **Priemer** | **SD** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Katéter 1 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 2 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 3 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 4 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 5 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 6 | | | | | | | | | | | | | |

**Poznámky**

.....

.....

.....

.....

.....

## G. Zoznam použitej literatúry

Bink A, Kucharíková S, Neirinck B, Vleugels J, Van Dijck P, Cammue BPA, et al. The nonsteroidal antiinflammatory drug diclofenac potentiates the in vivo activity of caspofungin against candida albicans biofilms. J Infect Dis. 2012;206(11):1790–7.

Chandra J, Mukherjee PK. Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. Microbiol Spectr. 2015 Aug 6;3(4).

Chesnokova MG, Chesnokov VA, Mironov AY. APPLICATION OF SCANNING ELECTRONIC MICROSCOPY FOR THE PURPOSE OF STUDYING CANDIDA ALBICANS BIOFILM ON THE SURFACE OF BASIC PLASTICS OF REMOVABLE ORTHOPEDIC DESIGNS. Russ Clin Lab Diagnostics. 2019 Oct 7;64(5):308–13.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. 1985;22(6):996–1006.

Gao J, Wang H, Li Z, Wong AH-H, Wang Y-Z, Guo Y, et al. Candida albicans gains azole resistance by altering sphingolipid composition. Nat Commun. 2018 Dec 29;9(1):4495.

Holtappels M, Swinnen E, De Groef L, Wuyts J, Moons L, Lagrou K, et al. Antifungal Activity of Oleylphosphocholine on In Vitro and In Vivo Candida albicans Biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Oct 23;62(1).

Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of Candida albicans is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol. 2003;41(7):2961–7.

Kania RE, Lamers GEM, van de Laar N, Dijkhuizen M, Lagendijk E, Tran Ba Huy P, et al. Biofilms on tracheoesophageal voice prostheses: a confocal laser scanning microscopy demonstration of mixed bacterial and yeast biofilms. Biofouling. 2010 Jun 3;26(5):519–26.

Kucharíková S, Neirinck B, Sharma N, Vleugels J, Lagrou K, Van Dijck P. In vivo Candida

glabrata biofilm development on foreign bodies in a rat subcutaneous model. J Antimicrob Chemother. 2015;70(3):846–56.

Kucharíková S, Sharma N, Spriet I, Maertens J, Van Dijck P, Lagrou K. Activities of systemically administered echinocandins against in Vivo mature Candida albicans biofilms developed in a rat subcutaneous model. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(5):2365–8.

Kucharíková S, Tournu H, Holtappels M, Van Dijck P, Lagrou K. In vivo efficacy of anidulafungin against mature Candida albicans biofilms in a novel rat model of catheter-associated candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(10):4474–5.

Kucharíková S, Tournu H, Lagrou K, van Dijck P, Bujdáková H. Detailed comparison of Candida albicans and Candida glabrata biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. J Med Microbiol. 2011;60(9):1261–9.

Kumamoto CA. Candida biofilms. Curr Opin Microbiol. 2002 Dec;5(6):608–11.

Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species Candida albicans biofilms. Nat Rev Microbiol. 2018 Jan 3;16(1):19–31.

Nailis H, Vandenbosch D, Deforce D, Nelis HJ, Coenye T. Transcriptional response to fluconazole and amphotericin B in Candida albicans biofilms. Res Microbiol. 2010 May;161(4):284–92.

Nett JE, Crawford K, Marchillo K, Andes DR. Role of Fks1p and Matrix Glucan in Candida albicans Biofilm Resistance to an Echinocandin, Pyrimidine, and Polyene. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Aug;54(8):3505–8.

Otto M. Staphylococcal Biofilms. Microbiol Spectr. 2018 Aug 2;6(4).

Řičicová M, Kucharíková S, Tournu H, Hendrix J, Bujdáková H, Van Eldere J, et al. Candida albicans biofilm formation in a new in vivo rat model. Microbiology. 2010;156(3):909–19.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. Cancer Res. 1988;48(17):4827–33.

Slettengren M, Mohanty S, Kamolvit W, van der Linden J, Brauner A. Making medical devices safer: impact of plastic and silicone oil on microbial biofilm formation. J Hosp Infect. 2020 Sep;106(1):155–62.

Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. Clin Oral Investig. 2013 Apr 21;17(3):841–50.

Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of Candida albicans biofilm. Mobley H, editor. Pathog Dis. 2016 Jun;74(4):ftw018.

Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. Candida albicans biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. Curr Opin Microbiol. 2019 Dec;52:1–6.

Weerasekera MM, Wijesinghe GK, Jayarathna TA, Gunasekara CP, Fernando N, Kottegoda N, et al. Culture media profoundly affect Candida albicans and Candida tropicalis growth, adhesion and biofilm development. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016 Nov;111(11):697–702.

Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, et al. Novel Entries in a Fungal Biofilm Matrix Encyclopedia. MBio. 2014 Aug 5;5(4).

# ÚLOHA Č. 4: *CANDIDA ALBICANS – STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DUÁLNE BIOFILMY

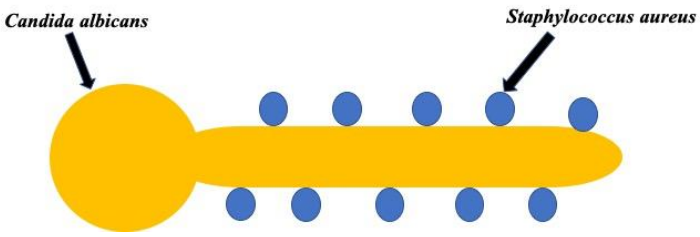
## A. Teoretický úvod

Polymikrobiálne infekcie zapríčinené kombináciou mikroorganizmov zodpovedajú za zvýšenú morbiditu a mortalitu u imunokompromitovaných pacientov (Brogden et al. 2005). Pri týchto ochoreniach môže prítomnosť jedného mikroorganizmu predisponovať hostiteľa ku kolonizácii inými. Navyše, pri aditívnych polymikrobiálnych infekciách môžu dva alebo viac nepatogénnych mikroorganizmov spôsobiť ochorenie (Kong and Jabra-Rizk 2015). Väčšina týchto problémov je zapríčinená u pacientov so zníženou funkciou imunitného systému práve schopnosťou mikroorganizmov vytvárať polymikrobiálne biofilmy. *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter spp*. patria medzi baktérie zodpovedné za tento druh infekcií (Mulani et al. 2019). Taktiež, *Candida spp*., konkrétne *Candida albicans* ľahko vytvára biofilmy v kombinácii s inými mikroorganizmami, najmä baktériami a inými kvasinkami. Napríklad, spolužitie *C. albicans* so *S. aureus*, *Streptococcus mutans* a *Fusobacterium spp*. bolo preukázané v práci Pathirana et al. (2019) (Pathirana et al. 2019).

Zistilo sa, že v ústnej dutine *Candida spp*. koexistujú s viacerými bakteriálnymi druhmi, vrátane *S. aureus*, *Streptococcus gordonii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*. a *Pseudomonas spp*. (Metwalli et al. 2013). Tvorba týchto polymikrobiálnych biofilmov má priamu koreláciu s použitím zubných protéz, pričom biofilmy sa tvoria na povrchu týchto náhrad alebo priamo na sliznici úst (Thein et al. 2009). Synergická interakcia bola pozorovaná i medzi *C. albicans* a Gram negatívnou anaeróbnou baktériou *Porphyromonas gingivalis*, ktorá zapríčiňuje ochorenia ústnej dutiny (Sztukowska et al. 2018). Symbiotický vzťah bol tiež popísaný medzi *C. albicans* a *Streptococcus mutans*, baktériou, ktorá hrá dôležitú úlohu pri vzniku zubného kazu (Falsetta et al. 2014). Navyše, niektoré bakteriálne druhy, ako napríklad *S. gordonii*, sú schopné podporiť tvorbu hýf a produkciu biofilmu *C. albicans* v prítomnosti ľudských slín, čím prispievajú k vytvoreniu polymikrobiálneho biofilmu (Lebeaux et al. 2014). V pľúcach pacientov s cystickou fibrózou bola pozorovaná interakcia *Candida spp*. s *Burkholderia cenocepacia* (Lebeaux et al. 2014). Spolužitie *Candida spp*. s *Mycobacterium tuberculosis* bolo zaznamenané u pacientov s tuberkulózou (Ochieng et al. 2006). Spolupráca pri tvorbe biofilmov v gastrointestinálnom trakte bola detegovaná medzi *E. coli* a *C. albicans* (Hermann et al. 1999). Infekcie súvisiace s prítomnosťou *Candida spp*. v polymikrobiálnych biofilmoch v gastrointestinálnom trakte

spôsobujú oveľa vyššiu úmrtnosť v porovnaní s polymikrobiálnymi biofilmami, ktoré sú zložené iba z viacerých baktérií (Barraclough et al. 2010).

Spolunažívanie prospešné pre oba mikroorganizmy bolo pozorované i medzi *C. albicans* a patogénnou baktériou *S. aureus*. Oba tieto mikroorganizmy sú prirodzenou súčasťou ľudského mikrobiómu. Napriek tomu, dokážu vyvolať ochorenie u pacientov so zníženou funkciou imunitného systému (Bernard et al. 2020). V poslednom období prišlo k objasneniu interakcie medzi touto kvasinkou a baktériou, najmä v súvislosti so vznikom *C. albicans – S. aureus* polymikrobiálnych infekcií asociovaných s biofilmom. *C. albicans* a *S. aureus* tvorili zmiešané biofilmy na biotických a abiotických povrchoch, pričom *S. aureus* vykazoval vysokú afinitu ku hýfam *C. albicans* (obrázok č. 8).




**Obrázok č. 8.** Adherencia bakteriálnych buniek *Staphylococcus aureus* na *Candida albicans* hýfu počas tvorby polymikrobiálnych biofilmov.

Táto interakcia bola sprostredkovaná adhezínom *C. albicans* Als3p (Peters et al. 2012). Navyše, *in vivo* štúdie použitím myšacieho modelu preukázali, že koinfekcia *C. albicans* a *S. aureus* v orálnom tkanive viedla k systémovej stafylokokovej infekcii (Schlecht et al. 2015). Okrem toho, z týchto *in vivo* poznatkov vyplynulo, že úloha Als3p je kľúčová v počiatočných štádiách simultánnej kolonizácie u zvierat. Kong et al. (2015), prispeli k objasneniu vzťahu medzi *C. albicans* a *S. aureus* počas orofaryngeálnej kandidózy (Kong et al. 2015). Z ich zistení vyplynulo, že primárna orálna kandidóza predstavuje predispozíciu pre vznik sekundárnej stafylokokovej infekcie. Táto masívna polymikrobiálna infekcia viedla k zvýšenej morbidite a mortalite hostiteľa. Histopatológia infikovaných jazykov ukázala inváziu hýf *C. albicans* spojenú s hlbokou infiltráciou bakteriálnych buniek. Podobne ako v publikácii Slecht et al. (2015), i Kong et al. (2015), preukázali dôležitosť *C. albicans* Als3p počas tvorby duálnych biofilmov na sliznici jazyka myší (Kong et al. 2015).

Na druhej strane, okrem symbiotického správania, existuje i antagonistický vzťah medzi niektorými mikroorganizmami. Typickým príkladom je interakcia medzi *C. albicans* a Gram negatívnou baktériou *Pseudomonas aeruginosa* (Fourie et al. 2016). Zistilo sa, že *P. aeruginosa* po adherencii na *C. albicans* produkuje toxické zlúčeniny fenazínu a homoserín laktóny, ktoré

zabraňujú morfogenéze kvasiniek, čo má za následok usmrtenie bunky (Morales et al. 2010). V gastrointestinálnom trakte bol pozorovaný antagonizmus medzi *C. albicans* a *Enterococcus faecalis* (Donskey 2004). Napokon, *Lactobacillus spp*. (*Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus reuteri*) inhibovali tvorbu hýf a biofilmu *Candida spp*. vo vulvovaginálnom prostredí (Jang et al. 2019).

Terapia polymikrobiálnych infekcií asociovaných s biofilmom je extrémne ťažká najmä z dôvodu druhovej heterogenity a synergických medzidruhových interakcií. Výsledky Harriott a Noverr (2009), preukázali až 1000-krát násobnú odolnosť buniek *S. aureus* proti antibiotiku vankomycínu počas tvorby biofilmu s *C. albicans* v porovnaní s planktonickými bunkami (Harriott and Noverr 2009). Počas *C. albicans – S. aureus* duálnych biofilmov boli bakteriálne bunky pokryté silnou vrstvou extracelulárneho polymérneho materiálu, ktorý znemožnil prienik vakomycínu k bunkám *S. aureus* (Harriott and Noverr 2009). Ďalšie štúdie charakterizovali fungálny polysacharid *β*-1,3-glukán ako hlavnú zložku extracelulárnej matrix brániacu prieniku vankomycínu do štruktúry biofilmu (Kong et al. 2016). Okrem toho, Kong et al. (2017), identifikovali farnesol, známu „*quorum sensing*“ molekulu, ktorá spôsobila zvýšenú expresiu génov kódujúcich efluxné pumpy, čo viedlo k „*vypumpovaniu*“ terapeutika von z bakteriálnych buniek počas *C. albicans – S. aureus* duálnych biofilmov (Kong et al. 2017). Dôležitú úlohu pre integritu a údržbu stafylokokových biofilmov zohráva práve extracelulárna DNA (eDNA). V skutočnosti, eDNA a polysacharidový intracelulárny adhezín (polysaccharide intercellular adhesin – PIA) predstavujú hlavné komponenty extracelulárnej matrix biofilmov *S. aureus* (Pammi et al. 2013). Výsledky Vila et al. (2021), preukázali, že natrávenie *C. albicans – S. aureus* duálnych biofilmov enzýmom DNáza I a následné ošetrenie buniek vankomycínom viedlo k sprístupneniu distribúcie antibiotika a citlivosti bakteriálnych buniek voči tomuto terapeutiku (Vila et al. 2021).

Tieto zistenia naznačujú, že proces interakcie *C. albicans* a *S. aureus* je zložitý a multifaktoriálny. Budúce štúdie by sa preto mali zamerať na návrh vhodných zvieracích modelov na preskúmanie vplyvu medzidruhových interakcií na hostiteľa, najmä ak zahŕňajú komenzálne druhy s vysokým patogénnym potenciálom.

## B. Protokol č. 1: Príprava *C. albicans – S. aureus* duálnych biofilmov v polyuretánových katétroch

**Pomôcky**

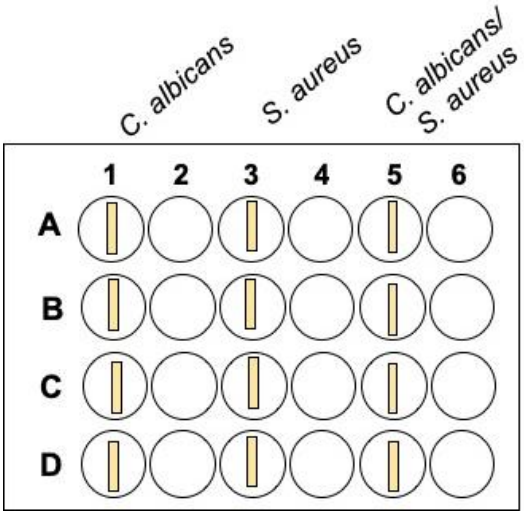
- *C. albicans* SC5314

- *Staphylococcus aureus* USA300
- 24 – jamková platnička s plochým dnom
- Polyuretánový katéter, ktorý je súčasťou centrálneho venózneho katétra (Multi-Lumen Central Venous Catheterization Set with Blue FlexTip® Catheter, CV-15703, Arrow International Reading, USA)
- Fetálne bovínne sérum (99 %)
- 1 x PBS
- Sterilná destilovaná voda
- YPD médium
- RPMI 1640 – MOPS médium
- 0,6 x TSB médium s prídavkom glukózy (0.2 %) (TSBg)
- YPD Petriho misky
- TSB agarové platne
- Etanol (96 %)
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Skalpel
- Pinzeta
- Pravítko
- Pipety
- Falkónové skúmavky (50 ml)
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Kyvety
- Bürkerova komôrka
- Vortex
- Termostat
- Centrifúga
- Nádoba s ľadom

**Pracovný postup**

1) Celonočnú kultúru *S. aureus* USA300 pripravíme prenesením jedného očka baktérií do 0,6 x TSB média s prídavkom glukózy (TSBg).
2) Inkubujeme pri 37 °C za stáleho trepania.

3) *C. albicans* SC5314 pripravíme inkubovaním v YPD médiu pri 37 °C, O/N.
4) 24 h pred experimentom pripravíme polyuretánové katétre (1 cm kúsky) a vložíme do Eppendorf skúmavky (2 ml).
5) Pridáme fetálne bovínne sérum a skúmavku jemne vortexujeme aby prišlo k distribúcii séra do jednotlivých lúmenov. Pridáme ešte pár kvapiek séra aby katétre boli ponorené v roztoku.
6) Katétre inkubujeme pri 37 °C, O/N, staticky.
7) Celonočnú kultúru baktérií zriedime 1:100 v TSBg médiu a necháme inkubovať pri teplote 37 °C, 3 h za stáleho trepania. Tento krok slúži na dosiahnutie exponenciálneho rastu *S. aureus*.
8) Podobne ako bakteriálne bunky, kvasinky riedime 1:100 v YPD médiu a inkubujeme pri 30 °C, 3 h za stáleho trepania.
9) Baktérie i kvasinky prenesieme do falkónov a centrifugujeme (5 000 rpm) pri izbovej teplote.
10) Supernatanty vylejeme do zbernej nádoby a pelet rozpustíme v 25 ml 1 x PBS a opäť premyjeme. Tento krok opakujeme dvakrát.
11) Po poslednom premývaní odsajeme prebytočné PBS a bunky rozpustíme v 2 ml 1 x PBS.
12) *C. albicans* i *S. aureus* bunky riedenie 1:10 v kyvetách a meriame $OD_{600}$ spektrofotometrom. Z našich predchádzajúcich experimentov vieme, že $OD_{600}$ 1.0 *C. albicans* odpovedá 1x $10^7$ buniek/ml, kdežto rovnaké $OD_{600}$ *S. aureus* predstavuje 1x $10^8$ buniek/ml.
13) Následne si pripravíme suspenziu kvasiniek (5 x $10^4$ buniek/ml) a baktérií (5 x $10^4$ buniek/ml) v RPMI 1640 – MOPS médiu.
14) Katétre inkubované vo fetálnom bovínnom sére prenesieme do 24-jamkovej platničky ako je uvedené nižšie na obrázku č. 9.




**Obrázok č. 9.** Príprava 24 jamkovej polystyrénovej platničky pre tvorbu *C. albicans* SC5314 a *S. aureus* USA300 mono species a *C. albicans – S. aureus* duálnych biofilmov v polyuretánových katétroch. Žlté prúžky reprezentujú katétre.

15) Pre mono species biofilmy prenesieme 500 µl uvedenej suspenzie kvasiniek alebo baktérií ku katétrom a pridáme 500 µl RPMI 1640 – MOPS média (zohriate na izbovú teplotu).
16) V prípade duálnych biofilmov prenesieme 500 µl kvasiniek + 500 µl baktérií k jednotlivým katétrom.
17) Katétre zatlačíme jemne na dno jamiek.
18) Takto pripravené vzorky inkubujeme pri 37 °C, 90 min, staticky (perióda adherencie).
19) Aspiráciou odstránime okolité médium a dávame veľký pozor aby neprišlo ku kontaminácii mono species biofilmov.
20) Jednotlivé katétre premyjeme pomocou 1 x PBS (1 ml). Katétre uchopíme kolmo do sterilnej pinzety a kvapkáme PBS priamo na jednotlivé lúmeny. Prúd PBS má byť dostatočne jemný aby neprišlo k odplaveniu adherovaných buniek. Tento krok opakujeme dvakrát.
21) Premyté katétre prenesieme do jamiek novej 24 jamkovej polystyrénovej platničky. Prebytočné 1 x PBS odstránime jemnou aspiráciou z okolia katétrov.
22) K jednotlivým katétrom pridáme 1 ml RPMI 1640 – MOPS média (zohriate na izbovú teplotu).
23) Opäť jemne zatlačíme katétre na dno jamiek.
24) Platničku inkubujeme pri 37 °C, 24 h, staticky (perióda tvorby biofilmu).
25) Následne všetky katétre premyjeme pomocou 1 x PBS (1 ml) ako je uvedené v kroku č. 20.
26) Každý premytý katéter vložíme do vopred pripravenej Eppendorf skúmavky, ktorá obsahuje 1 ml 1 x PBS.

27) Eppendorf skúmavky, ktoré obsahujú katéter vložíme do ľadu (zastavenie všetkých biologických procesov) a biofilmy kvantifikujeme pomocou metódy kolónie tvoriacich jednotiek (colony forming units – CFU).

**C. Protokol č. 2: Vyhodnotenie tvorby duálneho biofilmu na základe kolónie tvoriacich jednotiek (CFU)**

**Pomôcky**

- Eppendorf skúmavky s premytými katétrami (uvedené vyššie)
- 1 x PBS
- YPD Petriho misky
- TSB agarové misky
- YPD agarové misky s prídavkom vankomycínu (10 mg/L)
- TSB agarové misky s prídavkom amfotericínu B (8 mg/L)
- 70% etanol
- Sterilná gáza
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Pinzeta
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Pipety
- Sterilné špičky (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Termostat
- Vortex
- Ultrazvukový sonikátor
- Nádoba s ľadom

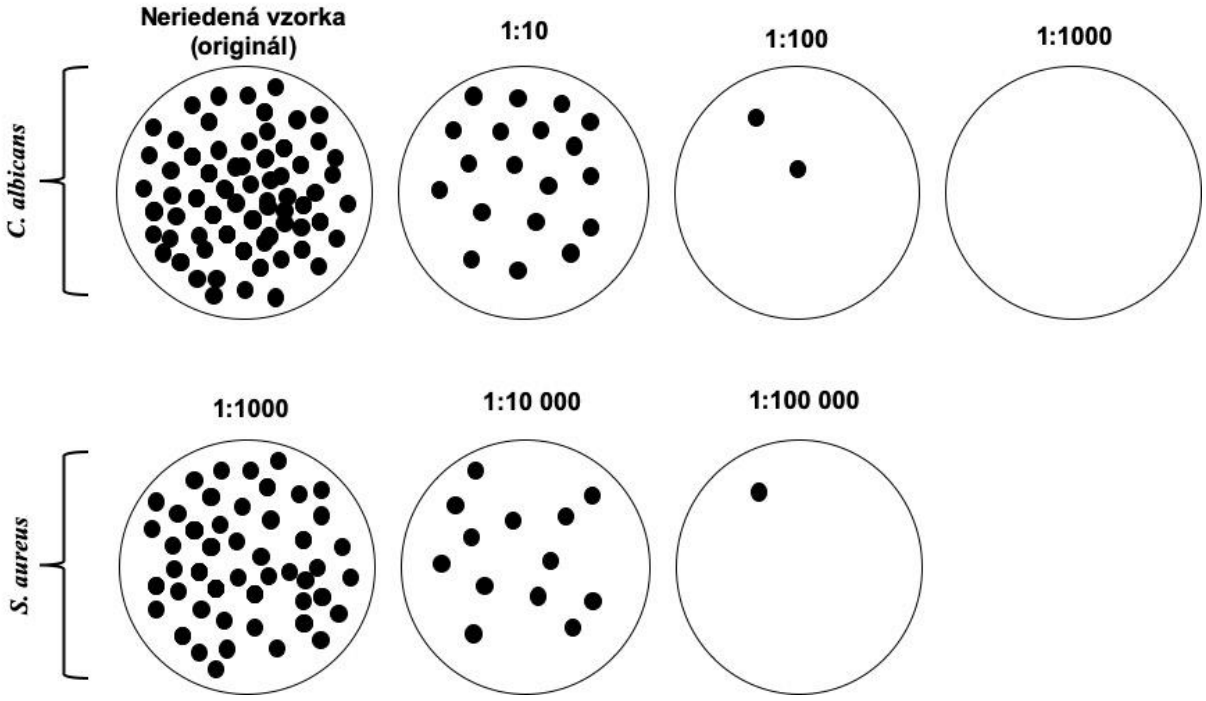
**Pracovný postup**

1) Ultrazvukový sonikátor dezinfikujeme pomocou 70 % etanolu na začiatku experimentu i pred každou vzorkou. Zvyšky etanolu odstránime sterilnou gázou.
2) Eppendorf skúmavky s jednotlivými katétrami sonikujeme po dobu 10 s a okamžite vložíme do ľadu.
3) Následne každú Eppendorf skúmavku vortexujeme 30 s pri vysokých otáčkach a vzorky vložíme späť do ľadu.

4) Pripravíme Eppendorf skúmavky s desiatkovým riedením (1:10, 1:100 a 1:1000 pre *C. albicans* a 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 a 1:100 000 pre selekciu *S. aureus*).
5) Originál i riedené vzorky (100 µl) prenesieme na pripravené Petriho misky. *C. albicans* bunky so single species biofilmov selektujeme na YPD platniach, kdežto biofilm – tvoriace bunky pochádzajúce z duálnych biofilmov vyselektujeme na YPD platniach s prídavkom vankomycínu (inhibícia rastu *S. aureus*). Každé riedenie vysievame na dve paralelné misky.
6) Bakteriálne bunky pochádzajúce z mono species biofilmov selektujeme na TSB agarových miskách. *S. aureus* biofilm – asociované bunky vysievame na TSB agarové platne s prídavkom amfotericínu B (inhibícia rastu *C. albicans*). V prípade selekcie *S. aureus* biofilmov vysievame iba nasledujúce riedenia: 1:1000, 1:10 000 a 1:100 000 aby sme dostali spočítateľné množstvo kolónií na miskách.
7) Všetky misky inkubujeme pri 37 °C, 24 h.

**Vyhodnotenie**

Jednotlivé kolónie spočítame a výsledné hodnoty uvedieme do tabuľky a prepočítame spolu s použitým riedením. Znázorníme graficky ako $\log_{10}$ buniek pomocou GraphPad PRISM software. Výsledky uvedieme do protokolu.



*C. albicans* (CA) mono species biofilmy

| **Vzorka CA** | **Originál** | | **1:10** | | **1:100** | | **1:1000** | | **Počet buniek** | **Počet buniek v 1 ml** | **$Log_{10}$** | **Priemer** | **SD** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Katéter 1 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 2 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 3 | | | | | | | | | | | | | |

*C. albicans* – *S. aureus* (CA/SA) duálne biofilmy, selekcia *C. albicans* (sel. CA)

| **Vzorka CA/SA sel. CA** | **Originál** | | **1:10** | | **1:100** | | **1:1000** | | **Počet buniek** | **Počet buniek v 1 ml** | **$Log_{10}$** | **Priemer** | **SD** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Katéter 1 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 2 | | | | | | | | | | | | | |
| Katéter 3 | | | | | | | | | | | | | |

*S. aureus* (SA) mono species biofilmy

| **Vzorka SA** | **1:1000** | | **1:10 000** | | **1:100 000** | | **Počet buniek** | **Počet buniek v 1 ml** | **$Log_{10}$** | **Priemer** | **SD** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Katéter 1 | | | | | | | | | | | |
| Katéter 2 | | | | | | | | | | | |
| Katéter 3 | | | | | | | | | | | |

*C. albicans* – *S. aureus* (CA/SA) duálne biofilmy, selekcia *S. aureus* (sel. SA)

| **Vzorka CA/SA sel. SA** | **1:1000** | | **1:10 000** | | **1:100 000** | | **Počet buniek** | **Počet buniek v 1 ml** | **$Log_{10}$** | **Priemer** | **SD** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Katéter 1 | | | | | | | | | | | |
| Katéter 2 | | | | | | | | | | | |
| Katéter 3 | | | | | | | | | | | |

**Poznámky**

.....

.....

.....

.....

.....

## D. Zoznam použitej literatúry

Barraclough K, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, et al. Polymicrobial Peritonitis in Peritoneal Dialysis Patients in Australia: Predictors, Treatment, and Outcomes. Am J Kidney Dis. 2010;55(1):121–31.

Bernard C, Girardot M, Imbert C. Candida albicans interaction with Gram-positive bacteria within interkingdom biofilms. J Mycol Med. 2020;30(1):100909.

Brogden KA, Guthmiller JM, Taylor CE. Human polymicrobial infections. Lancet. 2005;365(9455):253–5.

Donskey CJ. The role of die intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. Clin Infect Dis. 2004;39(2):219–26.

Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between Streptococcus mutans and Candida albicans synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. Infect Immun. 2014;82(5):1968–81.

Fourie R, Ells R, Swart CW, Sebolai OM, Albertyn J, Pohl CH. Candida albicans and Pseudomonas aeruginosa interaction, with focus on the role of eicosanoids. Front Physiol. 2016;7(FEB).

Harriott MM, Noverr MC. Candida albicans and Staphylococcus aureus form polymicrobial biofilms: Effects on antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(9):3914–22.

Hermann C, Hermann J, Munzel U, Rüchel R. Bacterial flora accompanying Candida yeasts in clinical specimens. Mycoses. 1999;42(11–12):619–27.

Jang SJ, Lee K, Kwon B, You HJ, Ko GP. Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of Candida albicans. Sci Rep. 2019;9(1):1–9.

Kong E, Jabra-Rizk MA. The Great Escape: Pathogen Versus Host. PLoS Pathog. 2015;11(3):1–5.

Kong EF, Kucharíková S, Van Dijck P, Peters BM, Shirtliff ME, Jabra-Rizka MA. Clinical implications of oral candidiasis: Host tissue damage and disseminated bacterial disease. Infect Immun. 2015;83(2):604–13.

Kong EF, Tsui C, Kucharíková S, Andes D, Van Dijck P, Jabra-Rizk MA. Commensal Protection of Staphylococcus aureus against Antimicrobials by Candida albicans Biofilm Matrix. MBio. 2016 Nov 2;7(5).

Kong EF, Tsui C, Kucharíková S, Van Dijck P, Jabra-Rizk MA. Modulation of Staphylococcus aureus Response to Antimicrobials by the Candida albicans Quorum Sensing Molecule Farnesol. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Dec 11;61(12).

Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. Microbiol Mol Biol Rev. 2014;78(3):510–43.

Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. Streptococcus mutans, Candida albicans, and the Human Mouth: A Sticky Situation. PLoS Pathog. 2013;9(10).

Morales DK, Jacobs NJ, Rajamani S, Krishnamurthy M, Cubillos-Ruiz JR, Hogan DA. Antifungal mechanisms by which a novel Pseudomonas aeruginosa phenazine toxin kills Candida albicans in biofilms. Mol Microbiol. 2010 Dec;78(6):1379–92.

Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. Front Microbiol. 2019;10(APR).

Ochieng W, Wanzala P, Bii C, Oishi I, Ichimura H, Lihana R, et al. Tuberculosis and oral Candida species surveillance in HIV infected individuals in Northern Kenya, and the implications of tuberculin skin test screening for DOPT-P. East Afr Med J. 2006 Jun 1;82(12).

Pammi M, Liang R, Hicks J, Mistretta TA, Versalovic J. Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of Staphylococcus epidermidis and Candida albicans. BMC Microbiol. 2013;13(1):1. Available from: BMC Microbiology

Pathirana RU, McCall AD, Norris HL, Edgerton M. Filamentous non-albicans Candida species adhere to Candida albicans and benefit from dual biofilm growth. Front Microbiol. 2019;10(MAY):1–12.

Peters BM, Ovchinnikova ES, Krom BP, Schlecht LM, Zhou H, Hoyer LL, et al. Staphylococcus aureus adherence to Candida albicans hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. Microbiol (United Kingdom). 2012;158(12):2975–86.

Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Hänsch GM, Filler SG, et al. Systemic Staphylococcus aureus infection mediated by Candida albicans hyphal invasion of mucosal tissue. Microbiol (United Kingdom). 2015;161(1):168–81.

Sztukowska MN, Dutton LC, Delaney C, Ramsdale M, Ramage G, Jenkinson HF, et al. Community development between Porphyromonas gingivalis and Candida albicans mediated by inIJ and Als3. MBio. 2018;9(2):1–16.

Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of Candida in mixed biofilms: A mini review. Mycoses. 2009;52(6):467–75.

Vila T, Kong EF, Montelongo-Jauregui D, Van Dijck P, Shetty AC, McCracken C, et al. Therapeutic implications of C. albicans-S. aureus mixed biofilm in a murine subcutaneous

catheter model of polymicrobial infection. Virulence. 2021;12(1):835–51.

# ÚLOHA Č. 5: STANOVENIE EXPRESIE GÉNOV POČAS TVORBY *CANDIDA ALBICANS* A *CANDIDA GLABRATA* BIOFILMU KVANTITATÍVNOU POLYMERÁZOVOU REŤAZOVOU REAKCIOU S REVERZNOU TRANSKRIPCIOU (RT - qPCR)

## A. Teoretický úvod.

Vývoj biofilmu je dynamický proces, ktorý je kontrolovaný súborom génov, ktorých expresia sa môže meniť vplyvom rôznych faktorov. Pomocou technológií rekombinantnej DNA bolo doposiaľ konštruovaných viacero delečných mutantov, ktorí boli podrobení skríningu tvorby biofilmu (Desai et al. 2014; Tsui et al. 2016). Navyše, proteomické analýzy a sledovanie transkripčného profilu génov celého genómu *C. albicans* („*genome-wide transciptional profiling*“) prispeli k odhaleniu viacerých génov a proteínov, ktoré sú rozdielne exprimované v planktonických bunkách a počas tvorby biofilmu (Nobile et al. 2012; Lohse et al. 2018). V roku 2006 bola popísaná úloha transkripčného faktora *C. albicans* Bcr1, ktorý sa priamo podieľa na tvorbe biofilmu (Nobile et al. 2006a). *C. albicans* kmeň s deléciou génu *CaBCR1* (*bcr1Δ/bcr1Δ*) je charakteristický tvorbou pravých hýf. Avšak schopnosť tvorby biofilmu *bcr1Δ/bcr1Δ* je značne znížená bez prítomnosti extracelulárnej matrix (Nobile and Mitchell 2005). Navyše *CaBCR1* reguluje expresiu adhezínov *C. albicans* Als3, Als1, Hwp1 and Ece1, ktoré zohrávajú esenciálnu úlohu počas adherencie na biotické a abiotické substráty (Araújo et al. 2017). Avšak, *C. albicans* kmeň s deléciou génu *CaALS1* (*als1Δ/alsΔ*) vytváral biofilm v centrálno – venóznom modeli s využitím potkana. Podobná situácia nastala s použitím *C. albicans als3Δ/als3Δ* mutantného kmeňa. Napokon, až delécia oboch funkčných alel oboch génov *CaALS1* a *CaALS3* (*als1Δ/alsΔ als3Δ/als3Δ*) viedla k tvorbe rudimentárneho biofilmu v *in vitro* i *in vivo* podmienkach (Nobile et al. 2008). Pre charakteristickú tvorbu *C. albicans* biofilmu je okrem Als1 a Als3 potrebný i povrchový proteín Hwp1 (Nobile et al. 2006b). Mutantný kmeň *C. albicans hwp1Δ/ hwp1Δ* produkoval iba bazálnu vrstvu biofilmu *in vitro* bez prítomnosti veľkého počtu hýf. Okrem toho, tento kmeň vykazoval defekty v tvorbe biofilmu *in vivo* v centrálno – venóznom modeli (Nobile et al. 2006b). Podobne ako adherencia, tvorba biofilmu i produkcia extracelulárnej matrix podlieha regulácii na génovej úrovni. Prvé informácie týkajúce sa tejto témy priniesli Nobile et al. (2009), popísaním transkripčného faktora *C. albicans* Zap1/Csr1, ktorý je označený za negatívneho regulátora produkcie extracelulárnej matrix (Nobile et al. 2009).

O niekoľko rokov neskôr bolo odhalených deväť „*hlavných*“ transkripčných regulátorov biofilmu *C. albicans* (Bcr1, Brg1, Efg1, Flo8, Gal4, Ndt80, Rfx2, Rob1 a Tec1), ktoré sú potrebné pre normálny vývoj biofilmu v *in vitro* i *in vivo* podmienkach (Nobile et al. 2012; Fox et al. 2015). Navyše, Brg1, Efg1, Flo8, Ndt80 a Tec1 hrajú dôležitú úlohu vo filamentácii *C. albicans* (Sudbery 2011). Ďalšie experimenty zamerané na skúmanie profilu expresie génov *C. albicans* odhalili komplex transkripčných dráh, ktoré majú za úlohu kontrolovať expresiu jednotlivých regulátorov navzájom, ako i kontrolu viacerých cieľových génov. Predpokladá sa, že spomínané transkripčné faktory regulujú expresiu viac ako 1000 cieľových génov, z ktorých niektoré sú ďalšími regulátormi transkripcie čím poskytujú rozsiahlu, komplexnú a vzájomne prepojenú sieť génov zodpovedných za tvorbu biofilmu *C. albicans* (Huang et al. 2019). Navyše, okrem vyššie uvedených hlavných transkripčných regulátorov, 44 génov podieľajúcich sa na regulácii transkripcie bolo charakterizovaných. Deléciou týchto génov sa potvrdila ich úloha pri tvorbe biofilmu *C. albicans* (Fox and Nobile 2012; Tsui et al. 2016; Rodriguez et al. 2020).

Rovnako ako u *C. albicans*, i u *C. glabrata* kontrola adherencie a tvorby biofilmu prebieha na úrovni génov. Esenciálnu rolu pri *C. glabrata* adhézii k plastom, ale aj tkanivovým kultúram zohráva skupina ~ 20 génov patriacich do „*rodiny*“ *EPA* (D’Enfert and Janbon 2015). Zvýšená expresia *CgEPA1* bola popísaná počas prvých štádií priľnutia buniek k ľudským epitelovým bunkám (Castaño et al. 2005). Na druhej strane *CgEPA6* bol upregulovaný počas vývoja biofilmu v *in vitro* podmienkach (Iraqui et al. 2005; Kucharíková et al. 2011). Okrem toho, zvýšená regulácia génov *CgEPA6* a *CgEPA3* bola zaznamenaná počas *in vivo C. glabrata* biofilmu v subkutánnom modeli s využitím potkana (Kucharíková et al. 2015). Kraneveld et al. (2011), charakterizovali zmeny v kontrole génov *CgEPA3, CgEPA6, CgEPA7* a *CgEPA22* počas tvorby biofilmu *in vitro* v dvoch rôznych médiách. Tento fakt poukazuje na skutočnosť, že expresia týchto génov je prísne regulovaná v závislosti od rastových podmienok (Kraneveld et al. 2011). Navyše, expresia *CgEPA1* a *CgEPA6* závisí aj od štádia rastu. Zatiaľ čo upregulácia *CgEPA1* nastáva počas exponenciálneho rastu, zvýšená expresia *CgEPA6* sa deje v neskorej stacionárnej fáze (De Las Peñas et al. 2003). *C. glabrata AWP* rodina adhezínov predstavuje ďalšiu skupinu génov podieľajúcich sa na tvorbe biofilmu (D’Enfert and Janbon 2015). Napriek tomu, že ich úloha v procesoch infekcie *C. glabrata* nie je až tak známa, gény *CgAWP2, CgAWP3* a *CgAWP5* vykazovali vyššiu expresiu v priebehu *in vivo* tvorby biofilmu v porovnaní s *in vitro* (Kucharíková et al. 2015).

Rozdiely v expresii týchto génov poukazujú na skutočnosť, že proces infekcie veľmi závisí od prostredia. Na pochopenie infekcií asociovaných s biofilmom sú nevyhnutné ďalšie

štúdie génov podieľajúcich sa najmä na tvorbe biofilmu v *in vivo* podmienkach.

**B. Protokol č. 1. Izolácia RNA pomocou RiboPure™ - Yeast kit**

**Pomôcky**

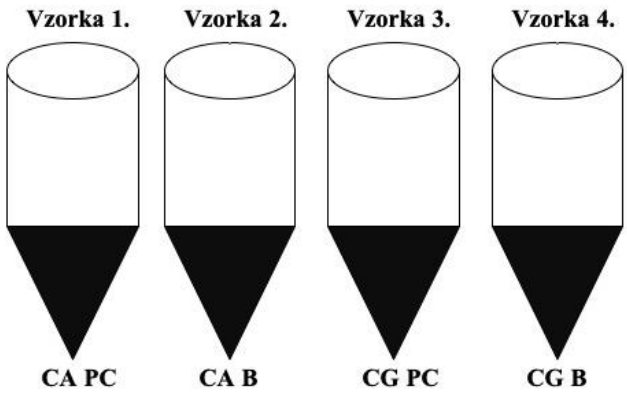
- *C. albicans* SC5314 a *C. glabrata* ATCC2001 planktonické bunky a biofilmy vytvorené na dne 6 – jamkovej polystyrénovej platničky
- 1 x PBS
- Sterilná škrabka na odstránenie biofilmu
- Ľadovo vychladená sterilná voda ošetrená dietyl pyrokarbonátom (DEPC)
- RNase*Zap* roztok (Ambion, Life Technologies, USA)
- RiboPure™ – Yeast kit (AM 1926, Ambion, Life Technologies, USA)
- Reverse Transcription System (A3500, Promega, USA)
- 100% Etanol
- Falkónové skúmavky (15 ml)
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Pipety
- Sterilné špičky s filtrom (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Vortex
- Centrifúga s možnosťou chladenia (max. otáčky 12 000 g)
- Stolný inkubátor s možnosťou nastavenia teploty 37 °C až 95 °C
- Nádoba s ľadom

**Pracovný postup**

- **Príprava *C. albicans* a *C. glabrata* planktonických a biofilm-tvoriacich buniek na izoláciu RNA**

1) Pripravíme si bunky ako je uvedené v úlohe 3, bod B.
2) *C. albicans* a *C. glabrata* bunky rozsuspendujeme v RPMI 1640 – MOPS médiu zohriatom na izbovú teplotu.

3) Prepočítame na výslednú koncentrácia 1 x $10^7$ buniek/ml. Pripravíme 8 ml kultúry buniek *C. albicans* a 8 ml kultúry *C. glabrata*.
4) Do troch vrchných jamiek pipetujeme 2 ml/jamka suspenziu kvasiniek *C. albicans* a do troch spodných jamiek pridáme 2 ml/jamka buniek *C. glabrata*.
5) Periódu adherencie docielime inkubáciou platničky pri 37 °C, 90 min, staticky.
6) Jednotlivé jamky premyjeme pomocou 1 x PBS (2 ml). Tento krok opakujeme dvakrát. Po poslednom premytí jemne odstránime zvyšky premývacieho roztoku.
7) Do každej jamky pridáme 3 ml RPMI 1640 – MOPS média (zohriate na izbovú teplotu).
8) Platničku inkubujeme pri 37 °C, 24 h, staticky (tvorba biofilmu).
9) 6 – jamkovú platničku s vytvoreným biofilmom položíme na ľad aby sme zastavili všetky biologické procesy v bunkách.
10) Opatrne odpipetujeme vrchnú vrstvu buniek a prenesieme ju do sterilnej Eppendorf skúmavky (táto vzorka zodpovedá planktonickým bunkám). Vzorky vložíme ihneďdo ľadu.
11) Biofilmy vytvorené na dne jamiek premyjeme 2 x pomocou ľadovo vychladenej sterilnej vody ošetrenej DEPC.
12) Nakoniec do každej jamky pridáme 1 ml vody ošetrenej DEPC.
13) Biofilm-tvoriace bunky zoškrabeme pomocou sterilnej škrabky a obsah prenesieme do vopred pripravených Eppedorf skúmaviek. Po poslednom premytí odstránime zvyšky roztoku pipetou.
14) Skúmavky vložíme do ľadu. V nasledujúcich krokoch pracujeme so vzorkami ako je uvedené na obrázku č. 10.




**Obrázok č. 10.** Vzorky určené k izolácii RNA. *C. albicans* planktonické bunky (CA PC), *C. albicans* biofilm – tvoriace bunky (CA B), *C. glabrata* planktonické bunky (CG PC) a *C. glabrata* biofilm – asociované bunky (CG B).

- **Izolácia RNA pomocou RiboPure™ – Yeast kit (AM 1926, Ambion, Life Technologies, USA) na základe odporúčania výrobcu s čiastočnou modifikáciou**

1) Po celý čas izolácie RNA nosíme ochranné rukavice a nedotýkame sa zbytočne predmetov, ktoré by mohli zapríčiniť degradáciu RNA.
2) Pracovný stôl i pipety ošetríme pomocou roztoku RNase*Zap*, ktorý slúži na dekontamináciu.
3) Eppendorf skúmavky, ktoré obsahujú planktonické i biofilm – asociované bunky centrifugujeme pri 4 °C, 2 min, 12 000 rpm.
4) Supernatant odstránime veľmi opatrne pipetou a skúmavky vložíme do ľadu.
5) Lýzu buniek dosiahneme pridaním nasledujúcich zložiek:
    a. 480 µl lyzačný roztok
    b. 48 µl 10 % SDS
    c. 480 µl Fenol:Chloroform:IAA
6) Vortexujeme pri vysokých otáčkach 15 s.
7) Celý obsah prenesieme do vopred pripravených skúmaviek (1.5 ml) so skrutkovacím uzáverom, ktoré obsahujú 750 µl ľadovo vychladených zirkónových guľôčok (súčasť kitu).
8) Centrifugujeme pri RT, 5 min, 14 000 rpm. Pri tomto kroku prichádza k separácii vodnej fázy, ktorá obsahuje RNA a organickej fázy obsahujúcej DNA a proteíny.
9) Vrchnú, vodnú fázu veľmi opatrne prenesieme do falkónových skúmaviek a pridáme 1,9 ml viažuceho roztoku (binding buffer). Dobre premiešame.
10) Ku každej vzorke pridáme 1,25 ml 100 % etanolu a premiešame vortexovaním.
11) Takto pripravenú zmes (650 µl) prenesieme do vopred pripravených kolóniek a centrifugujeme pri RT, 1 min, 12 000 rpm. Obsah zbernej nádoby vylejeme a opakujeme viackrát.
12) Filter kolónky premyjeme pomocou 650 µl premývacieho roztoku 1 (wash solution 1). Centrifugujeme pri RT, 1 min, 12 000 rpm a následne vylejeme obsah zbernej nádoby.
13) V ďalšom kroku premyjeme filter kolónky premývacím roztokom 2/3 (500 µl, wash solution 2/3), ktorý je súčasťou kitu. Tento krok opakujeme 2 x. Obsah zbernej nádoby opäť vylejeme.
14) Eppendorf skúmavku spolu s kolónkou centrifugujeme pri RT, 1 min, 12 000 rpm. Po centrifugácii premiestnime kolónku do novej Eppendorf skúmavky (2 ml).

15) Do stredu filtra pridáme 50 µl elučného roztoku (elution solution, zohriaty na 95 °C – 100 °C) a centrifugujeme pri RT, 1 min, 12 000 rpm.

- **Ošetrenie izolovanej RNA pomocou DNázy I (súčasť RiboPure™ – Yeast kit, AM 1926, Ambion, Life Technologies, USA) na základe odporúčania výrobcu s čiastočnou modifikáciou**

1) Pripravíme zmes (príklad je uvedený pre 1 vzorku), ktorá je zložená z nasledujúcich komponentov (pracujeme pri RT):
    a. 50 µl RNA (izolácia v predchádzajúcom kroku)
    b. 5 µl 10 x koncentrovaný pufor 1
    c. 4 µl enzým DNáza I
2) Takto pripravenú zmes inkubujeme pri 37 °C, 30 min.
3) K reakcii pridáme 6 µl inaktivačného roztoku (Dnase inactivation reagent), ktorý vedie k inaktivácii DNázy I.
4) Vortexujeme a necháme stáť pri RT, 5 min.
5) Centrifugujeme pri RT, 3 min, 12 000 rpm.
6) Supernatant obsahujúci RNA prenesieme do novej Eppendorf skúmavky a vložíme do ľadu.
7) Koncentráciu RNA stanovíme spektrofotometricky pomocou NanoDrop™ (ThermoFischer Scientific).
8) RNA skladujeme pri – 80 °C niekoľko mesiacov.

**C. Protokol č. 2. Prepis RNA do cDNA použitím Reverse Transcription System**

**Pomôcky**

- RNA z predchádzajúceho experimentu
- Reverse Transcription System (A3500, Promega, USA)
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Pipety
- Sterilné špičky s filtrom (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Vortex

- Centrifúga (max. otáčky 12 000 g)
- Stolný inkubátor s možnosťou nastavenia teploty 37 °C až 95 °C (v tomto kroku je najlepšie mať k dispozícii 2 stolné inkubátory)
- Nádoba s ľadom

**Pracovný postup**

1) Pracujeme podľa odporúčania výrobcu s čiastočnou modifikáciou.
2) Najskôr prenesieme 1 µg RNA do Eppendorf skúmavky a inkubujeme pri 70 °C, 10 min.
3) Všetky vzorky centrifugujeme pri RT, 30 s. Vzorky vložíme do ľadu.
4) Pripravíme si reakčnú zmes, ktorá pozostáva z nasledujúcich zložiek (príklad udáva prípravu zmesi pre 1 vzorku):
    a. 4 µl $MgCl_2$
    b. 2 µl pufor reverznej transkripcie (10 x koncentrovaný)
    c. 2 µl dNTP (10 mM)
    d. 0.5 µl inhibítor ribonukleáz
    e. 15 U enzým AMV reverzná transkriptáza
    f. 0.5 µg Oligo$(dt)_{15}$ primer
    g. 1 µg RNA
    h. Doplniť $H_2O$ zbavenou nukleáz do výsledného objemu 20 µl
5) Takto pripravenú reakčnú zmes inkubujeme pri 42 °C, 15 min.
6) Následne všetky vzorky zohrejeme na teplotu 95 °C po dobu 5 min (tento krok vedie k inaktivácii enzýmu AMV reverznej transkriptázy).
7) Všetky vzorky vložíme do ľadu na 5 min.
8) cDNA skladujeme pri – 20 °C.

**D. Protokol č. 3. Príprava reakčnej zmesi pomocou KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit.**

**Pomôcky**

- cDNA z predchádzajúceho experimentu
- KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit (Kapa Biosystems, USA)
- Primer (forward)

- Primer (reverse)
- 96 – jamkové platničky pre RT – qPCR
- Eppendorf skúmavky (1,5 ml a 2 ml)
- Pipety
- Sterilné špičky s filtrom (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Zberná nádoba na tekutý a tuhý odpad
- Vortex
- Centrifúga (centrifugácia 96 – jamkovej platničky)
- StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Nádoba s ľadom

**Pracovný postup**

1) Z dôvodu senzitivity substrátu KAPA SYBR® FAST na svetlo pracujeme v prostredí kde nie sú vzorky vystavené priamemu slnečnému žiareniu. Taktiež vzorky sú umiestnené v ľade.
2) Primery (tabuľka č. 2) riedime na výslednú koncentráciu 10 µM.

**Tabuľka č. 2.** Sekvencie primerov použitých pri RT qPCR.

| Primer | | Sekvencia primeru (5'→3') | Citácia |
|---|---|---|---|
| ***CaACT1*** | fwd | CTCTTCTGGTAGAACCACCGGTAT | (Řičicová et al. 2010) |
| | rev | TAAAGAGA AACCAGCGTAAATTGGA | |
| ***CaALS1*** | fwd | TTCTCATGAATCAGCATCCACAA | (Green et al. 2005) |
| | rev | CAGAATTTTCACCCATACTTGGTTTC | |
| ***CaALS3*** | fwd | AATGGTCCTTATGAATCACCATCTACTA | (Green et al. 2005) |
| | rev | GAGTTTTCATCCATACTTGATTTCACAT | |
| ***CaEAP1*** | fwd | CTGCTCACTCAACTTCAATTGTCG | (Řičicová et al. 2010) |
| | rev | GAACACATCCACCTTCGGGA | |
| ***CgACT1*** | fwd | CGCTTTGGACTTCGAACAAGAA | (Kucharíková et al. 2015) |
| | rev | GTTACCGATAGTGATGACTTGAC | |
| ***CgEPA1*** | fwd | AGCGTAATCAAGGAAACCAAAGA | (Kucharíková et al. 2015) |
| | rev | CATTTGAGTGTGTTTGTTTGATGTG | |
| ***CgEPA3*** | fwd | TCCAAGCAAAACAACTTTTCCA | (Kucharíková et al. 2015) |
| | rev | CGAAGCTTTACCCTTGTACTCTGA | |
| ***CgEPA6*** | fwd | TGATTATTTGAAATCAGGATCGAATC | (Kucharíková et al. 2015) |
| | rev | TGTCATTGTCAATGGTGTACGATAG | |

*Ca – Candida albicans*
*Cg – Candida glabrata*
fwd – forward primer
rev – reverse primer

3) Najskôr pripravíme reakčnú zmes (príprava pre 1 vzorku je uvedená nižšie v tabuľke č. 3), ktorá vedie k vytvoreniu relatívnej štandardnej krivky s presne stanovenou koncentráciou cDNA (50 ng, 10 ng, 2 ng, 0.4 ng a 0.05 ng) nami vybranej vzorky.

**Tabuľka č. 3.** Príprava reakčnej zmesi pre vzorky relatívnej štandardnej krivky.

| Zložka reakčnej zmesi | Množstvo |
|---|---|
| qPCR Master Mix (2 x) | 5 µl |
| Primer (10 µM, forward) | 0.2 µl |
| Primer (10 µM, reverse) | 0.2 µl |
| cDNA | 50 ng/10 ng/2 ng/ 0.4 ng/0.05 ng |
| Ultra čistá voda | doplniť do výsledného objemu 10 µl |

4) V nasledujúcom kroku pripravíme reakčnú zmes pre ostatné študované vzorky (príprava pre 1 vzorku je uvedená v tabuľke č. 4).

**Tabuľka č. 4.** Príprava reakčnej zmesi pre študované vzorky.

| Zložka reakčnej zmesi | Množstvo |
|---|---|
| qPCR Master Mix (2 x) | 5 µl |
| Primer (10 µM, forward) | 0.2 µl |
| Primer (10 µM, reverse) | 0.2 µl |
| cDNA | 2 µl |
| Ultra čistá voda | doplniť do výsledného objemu 10 µl |

5) Reakčnú zmes pipetujeme do 96 – jamkovej platničky pre RT – qPCR (obrázok č.9 a obrázok č.10). Každá vzorka je pipetovaná trojmo ako je uvedené na obrázku č. 9 a 10.V každej platničke musí byť prítomná negatívna kontrola, kde namiesto študovanej vzorky pipetujeme sterilnú $H_2O$).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A** | 50 ng *CaACT1* | 50 ng *CaACT1* | 50 ng *CaACT1* | 10 ng *CaACT1* | 10 ng *CaACT1* | 10 ng *CaACT1* | 2 ng *CaACT1* | 2 ng *CaACT1* | 2 ng *CaACT1* | 0.4 ng *CaACT1* | 0.4 ng *CaACT1* | 0.4 ng *CaACT1* |
| **B** | 0.05 ng *CaACT1* | 0.05 ng *CaACT1* | 0.05 ng *CaACT1* | CA PC *CaACT1* | CA PC *CaACT1* | CA PC *CaACT1* | CA B *CaACT1* | CA B *CaACT1* | CA B *CaACT1* | $H_20$ *CaACT1* | $H_2O$ *CaACT1* | $H_2O$ *CaACT1* |
| **C** | 50 ng *CaALS1* | 50 ng *CaALS1* | 50 ng *CaALS1* | 10 ng *CaALS1* | 10 ng *CaALS1* | 10 ng *CaALS1* | 2 ng *CaALS1* | 2 ng *CaALS1* | 2 ng *CaALS1* | 0.4 ng *CaALS1* | 0.4 ng *CaALS1* | 0.4 ng *CaALS1* |
| **D** | 0.05 ng *CaALS1* | 0.05 ng *CaALS1* | 0.05 ng *CaALS1* | CA PC *CaALS1* | CA PC *CaALS1* | CA PC *CaALS1* | CA B *CaALS1* | CA B *CaALS1* | CA B *CaALS1* | $H_20$ *CaALS1* | $H_2O$ *CaALS1* | $H_2O$ *CaALS1* |
| **E** | 50 ng *CaALS3* | 50 ng *CaALS3* | 50 ng *CaALS3* | 10 ng *CaALS3* | 10 ng *CaALS3* | 10 ng *CaALS3* | 2 ng *CaALS3* | 2 ng *CaALS3* | 2 ng *CaALS3* | 0.4 ng *CaALS3* | 0.4 ng *CaALS3* | 0.4 ng *CaALS3* |
| **F** | 0.05 ng *CaALS3* | 0.05 ng *CaALS3* | 0.05 ng *CaALS3* | CA PC *CaALS3* | CA PC *CaALS3* | CA PC *CaALS3* | CA B *CaALS3* | CA B *CaALS3* | CA B *CaALS3* | $H_20$ *CaALS3* | $H_2O$ *CaALS3* | $H_2O$ *CaALS3* |
| **G** | 50 ng *CaEAP1* | 50 ng *CaEAP1* | 50 ng *CaEAP1* | 10 ng *CaEAP1* | 10 ng *CaEAP1* | 10 ng *CaEAP1* | 2 ng *CaEAP1* | 2 ng *CaEAP1* | 2 ng *CaEAP1* | 0.4 ng *CaEAP1* | 0.4 ng *CaEAP1* | 0.4 ng *CaEAP1* |
| **H** | 0.05 ng *CaEAP1* | 0.05 ng *CaEAP1* | 0.05 ng *CaEAP1* | CA PC *CaEAP1* | CA PC *CaEAP1* | CA PC *CaEAP1* | CA B *CaEAP1* | CA B *CaEAP1* | CA B *CaEAP1* | $H_20$ *CaEAP1* | $H_2O$ *CaEAP1* | $H_2O$ *CaEAP1* |

**Obrázok č. 9.** Schématické znázornenie prípravy 96 – jamkovej platničky pre študovanie expresie génov *C. albicans* metódou RT – qPCR. *C. albicans* planktonické bunky (CA PC), *C. albicans* biofilm – tvoriace bunky (CA B). Sterilná voda slúži ako negatívna kontrola.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A** | 50 ng *CgACT1* | 50 ng *CgACT1* | 50 ng *CgACT1* | 10 ng *CgACT1* | 10 ng *CgACT1* | 10 ng *CgACT1* | 2 ng *CgACT1* | 2 ng *CgACT1* | 2 ng *CgACT1* | 0.4 ng *CgACT1* | 0.4 ng *CgACT1* | 0.4 ng *CgACT1* |
| **B** | 0.05 ng *CgACT1* | 0.05 ng *CgACT1* | 0.05 ng *CgACT1* | CG PC *CgACT1* | CG PC *CgACT1* | CG PC *CgACT1* | CG B *CgACT1* | CG B *CgACT1* | CG B *CgACT1* | $H_20$ *CgACT1* | $H_2O$ *CgACT1* | $H_2O$ *CgACT1* |
| **C** | 50 ng *CgEPA1* | 50 ng *CgEPA1* | 50 ng *CgEPA1* | 10 ng *CgEPA1* | 10 ng *CgEPA1* | 10 ng *CgEPA1* | 2 ng *CgEPA1* | 2 ng *CgEPA1* | 2 ng *CgEPA1* | 0.4 ng *CgEPA1* | 0.4 ng *CgEPA1* | 0.4 ng *CgEPA1* |
| **D** | 0.05 ng *CgEPA1* | 0.05 ng *CgEPA1* | 0.05 ng *CgEPA1* | CG PC *CgEPA1* | CG PC *CgEPA1* | CG PC *CgEPA1* | CG B *CgEPA1* | CG B *CgEPA1* | CG B *CgEPA1* | $H_20$ *CgEPA1* | $H_2O$ *CgEPA1* | $H_2O$ *CgEPA1* |
| **E** | 50 ng *CgEPA3* | 50 ng *CgEPA3* | 50 ng *CgEPA3* | 10 ng *CgEPA3* | 10 ng *CgEPA3* | 10 ng *CgEPA3* | 2 ng *CgEPA3* | 2 ng *CgEPA3* | 2 ng *CgEPA3* | 0.4 ng *CgEPA3* | 0.4 ng *CgEPA3* | 0.4 ng *CgEPA3* |
| **F** | 0.05 ng *CgEPA3* | 0.05 ng *CgEPA3* | 0.05 ng *CgEPA3* | CG PC *CgEPA3* | CG PC *CgEPA3* | CG PC *CgEPA3* | CG B *CgEPA3* | CG B *CgEPA3* | CG B *CgEPA3* | $H_20$ *CgEPA3* | $H_2O$ *CgEPA3* | $H_2O$ *CgEPA3* |
| **G** | 50 ng *CgEPA6* | 50 ng *CgEPA6* | 50 ng *CgEPA6* | 10 ng *CgEPA6* | 10 ng *CgEPA6* | 10 ng *CgEPA6* | 2 ng *CgEPA6* | 2 ng *CgEPA6* | 2 ng *CgEPA6* | 0.4 ng *CgEPA6* | 0.4 ng *CgEPA6* | 0.4 ng *CgEPA6* |
| **H** | 0.05 ng *CgEPA6* | 0.05 ng *CgEPA6* | 0.05 ng *CgEPA6* | CG PC *CgEPA6* | CG PC *CgEPA6* | CG PC *CgEPA6* | CG B *CgEPA6* | CG B *CgEPA6* | CG B *CgEPA6* | $H_20$ *CgEPA6* | $H_2O$ *CgEPA6* | $H_2O$ *CgEPA6* |

**Obrázok č. 10.** Schéma prípravy 96 – jamkovej platničky pre stanovenie expresie génov *C. glabrata* metódou RT – qPCR. *C. glabrata* planktonické bunky (CG PC), *C. glabrata* biofilm – tvoriace bunky (CG B). Sterilná voda slúži ako negatívna kontrola.

6) Na takto pripravené platničky prilepíme adhezívnu fóliu a centrifugujeme pri nízkych otáčkach 30 s. Vložíme do StepOnePlus Real-Time PCR cyklera a nastavíme podmienky reakcie ako je uvedené v tabuľke č. 5:

**Tabuľka č. 5: Nastavenie podmienok reakcie pre RT – qPCR.**

| Krok | Názov cyklu | ° C | čas | Počet opakovaní |
|---|---|---|---|---|
| 1. | Počiatočná denaturácia | 95 | 5 min | 1 x |
| 2. | Denaturácia | 95 | 10 s | 40 x |
| | Anelácia primerov | 60 | 30 s | |
| | Polymerizácia | 72 | 20 s | |
| 3. | Krivka topenia | 95 | 5 s | - |
| | | 65 | 1 min | |
| | | 97 | kontinuálne cyklus/ °C | |
| 4. | Chladenie | 4 | - | - |

**E. Vyhodnotenie výsledkov Real-Time PCR pomocou metódy ΔΔct.**

Po ukončení reakcie sledujeme hodnoty Ct (cycle treshold). Je dôležité si uvedomiť, že čím je hodnota Ct nižšia, tým viacej bolo do reakcie dodanej templátovej DNA, a naopak. Ct hodnota je hlavný údaj s ktorým sa pracuje pri výpočtoch a pri stanovení expresie. Relatívnou kvantifikáciou sa porovnáva hladina expresie génu v študovanej vzorke k expresii génu v kontrolnej vzorke. Pri použití tejto metódy, musí prísť k tzv. normalizácii, to znamená porovnanie expresie sledovaného génu k expresii „*housekeeping*“ génu, v našom prípade *CaACT1* alebo *CgACT1*. Ratio (označené R – relative quantity) udáva relatívnu zmenu expresie a predstavuje násobok zmeny expresie cieľového génu medzi kontrolou a cieľovým génom. Výpočet expresie je uvedený nižšie:

$$\Delta Ct_{\text{testovaná vzorka}} = Ct_{\text{cieľový gén}} - Ct_{\text{housekeeping gén}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{testovaná vzorka}} - \Delta Ct_{\text{kontrolná vzorka}}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

**Poznámky**

.....

.....

.....

.....

.....

## F. Zoznam použitej literatúry

Araújo D, Henriques M, Silva S. Portrait of Candida Species Biofilm Regulatory Network Genes. Trends Microbiol. 2017;25(1):62–75.

Castaño I, Pan SJ, Zupancic M, Hennequin C, Dujon B, Cormack BP. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in Candida glabrata. Mol Microbiol. 2005;55(4):1246–58.

D'Enfert C, Janbon G. Biofilm formation in Candida glabrata: What have we learnt from functional genomics approaches? FEMS Yeast Res. 2015;16(1):1–13.

Desai J V, Mitchell AP, Andes DR. and Recurrent Infection. 2014;1–18.

Fox EP, Bui CK, Nett JE, Hartooni N, Mui MC, Andes DR, et al. An expanded regulatory network temporally controls Candida albicans biofilm formation. Mol Microbiol. 2015;96(6):1226–39.

Fox EP, Nobile CJ. A sticky situation: Untangling the transcriptional network controlling biofilm development in Candida albicans. Transcription. 2012;3(6):315–22.

Green CB, Zhao X, Yeater KM, Hoyer LL. Construction and real-time RT-PCR validation of Candida albicans PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of ALS gene expression in budding and filamenting cells. Microbiology. 2005;151(4):1051–60.

Huang MY, Woolford CA, May G, Joel Mcmanus C, Mitchell AP. Circuit diversification in a biofilm regulatory network. PLoS Pathog. 2019;15(5):1–26.

Iraqui I, Garcia-Sanchez S, Aubert S, Dromer F, Ghigo JM, D'Enfert C, et al. The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in Candida glabrata in a Sir4p-dependent pathway. Mol Microbiol. 2005;55(4):1259–71.

KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit. KR0389 - v10.16 Technical data sheet. Wilmington, MA, USA. www.kapabiosystems.com

Kraneveld EA, de Soet JJ, Deng DM, Dekker HL, de Koster CG, Klis FM, et al. Identification and Differential Gene Expression of Adhesin-Like Wall Proteins in Candida glabrata Biofilms. Mycopathologia. 2011;172(6):415–27.

Kucharíková S, Neirinck B, Sharma N, Vleugels J, Lagrou K, Van Dijck P. In vivo Candida glabrata biofilm development on foreign bodies in a rat subcutaneous model. J Antimicrob Chemother. 2015;70(3):846–56.

Kucharíková S, Tournu H, Lagrou K, van Dijck P, Bujdáková H. Detailed comparison of Candida albicans and Candida glabrata biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. J Med Microbiol. 2011;60(9):1261–9.

De Las Peñas A, Pan SJ, Castaño I, Alder J, Cregg R, Cormack BP. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen Candida glabrata are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. Genes Dev. 2003;17(18):2245–58.

Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species Candida albicans biofilms. Nat Rev Microbiol. 2018 Jan 3;16(1):19–31.

Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan QT, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in C. albicans biofilm formation in vitro and in vivo. PLoS Pathog. 2006a;2(7):0636–49.

Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A Recently Evolved Transcriptional Network Controls Biofilm Development in Candida albicans. Cell. 2012 Jan;148(1–2):126–38.

Nobile CJ, Mitchell AP. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the C. albicans transcription factor Bcr1p. Curr Biol. 2005;15(12):1150–5.

Nobile CJ, Nett JE, Andes DR, Mitchell AP. Function of Candida albicans adhesin hwp1 in biofilm formation. Eukaryot Cell. 2006b;5(10):1604–10.

Nobile CJ, Nett JE, Hernday AD, Homann OR, Deneault JS, Nantel A, et al. Biofilm matrix regulation by Candida albicans Zap1. PLoS Biol. 2009;7(6).

Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary Adhesin Function in C. albicans Biofilm Formation. Curr Biol. 2008 Jul;18(14):1017–24.

Reverse Transcription System Technical Bulletin. A3500 Instructions for use of Product. Promega Corporation, Madison, WI, USA. www.promega.com

Řičicová M, Kucharíková S, Tournu H, Hendrix J, Bujdáková H, Van Eldere J, et al. Candida albicans biofilm formation in a new in vivo rat model. Microbiology. 2010;156(3):909–19.

RiboPure$^{TM}$ – Yeast kit Protocol AM 1926. Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA. www.lifetechnologies.com

Rodriguez DL, Quail MM, Hernday AD, Nobile CJ. Transcriptional Circuits Regulating Developmental Processes in Candida albicans. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10(December):1–20.

Sudbery PE. Growth of Candida albicans hyphae. Nat Rev Microbiol. 2011;9(10):737–48.

Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of Candida albicans biofilm. Mobley H, editor. Pathog Dis. 2016 Jun;74(4):ftw018.

# VŠEOBECNÁ ČASŤ

## ZÁSADY BEZPEČNOSTI PRI PRÁCI V MIKROBIOLOGICKOM LABORATÓRIU

Pred vstupom do laboratória a pred začatím samostatného cvičenia sa musia študenti oboznámiť so všeobecnými zásadami, ktoré musia striktne dodržiavať počas cvičenia v mikrobiologickom laboratóriu! V prípade zlého správania počas cvičenia môže vyučujúci vykázať daného študenta z cvičenia bez možnosti náhrady.

- Pred vstupom do laboratória si každý študent oblečie laboratórny plášť, ktorý musí byť zapnutý počas celého cvičenia.
- V laboratóriu je striktné zakázané jesť a konzumovať nápoje!
- Dlhé vlasy musia byť zviazané aby neprišli do kontaktu s chemikáliami, prípadne infekčným materiálom.
- Počas cvičenia majú študenti na očiach ochranné laboratórne okuliare.
- Ak má študent nejaký zdravotný problém, napríklad ekzém na rukách, začervenanie pokožky, alergia na niektorý materiál (latex, vinyl)... ihneď to oznámi pedagógovi, ktorý vedie dané cvičenie.
- Počas práce s materiálom v laboratóriu majú študenti na rukách rukavice. V prípade roztrhnutia rukavíc, alebo kontaminácie študent okamžite vyhodí rukavice a zoberie si nové. Kontaminované rukavice musia byť vhodené do červených plastových vriec.
- V priebehu praktického cvičenia študenti odkladajú kontaminovaný materiál do nádob na to určených, prípadne do červených plastových vriec. V prípade ak majú pochybnosti do akých nádob sa odkladá kontaminovaný materiál ihneď kontaktujú vyučujúceho.
- Ak príde k rozbitiu laboratórneho skla alebo pomôcok tak študent to oznámi vyučujúcemu.
- V prípade poranenia počas cvičenia treba ihneď kontaktovať vyučujúceho zodpovedného za cvičenie.
- Kontaminovaný tekutý materiál sa nikdy nevylieva do umývadla!
- Pipetovanie ústami je striktne zakázané.
- Počas cvičenia si študenti nevkladajú perá, ceruzky ani iné predmety do úst.
- Študenti pracujú v skupinách po dvoch, maximálne troch študentov.

- Ak majú študenti otázky počas cvičenia tak kontaktujú vyučujúceho a nevyrušujú spolužiakov.
- Po skončení cvičenia študenti upracú laboratórny stôl na ktorom pracovali a dekontaminujú ho použitím 70% etanolu.
- Pri odchode si študenti umyjú ruky antibakteriálnym mydlom.

**LABORATÓRNE KMENE**

| **NÁZOV** | **REFERENCIA** |
|---|---|
| *Candida albicans* SC5314 | (Gillum et al. 1984) |
| *Candida glabrata* ATCC2001 | American Type Culture Collection |
| *Candida tropicalis* ATCC750 | (Barchiesi et al. 2000) |
| *Candida dubliniensis* CCY 29-177-1 | (Melkusová et al. 2005) |
| *Staphylococcus aureus* USA300 | (Tenover and Goering 2009) |

**Zoznam použitej literatúry**

Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, Di Francesco LF, Caselli F, Giannini D, et al. Experimental induction of fluconazole resistance in Candida tropicalis ATCC 750. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(6):1578–84.

Gillum AM, Tsay EYH, Kirsch DR. Isolation of the Candida albicans gene for orotidine-5′-phosphate decarboxylase by complementation of S. cerevisiae ura3 and E. coli pyrF mutations. MGG Mol Gen Genet. 1984;198(1):179–82.

Melkusová S, Lisalová M, Pavlík P, Bujdáková H. The first clinical isolates of Candida dubliniensis in Slovakia. Mycopathologia. 2005;159(3):369–71.

Tenover FC, Goering R V. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300: Origin and epidemiology. J Antimicrob Chemother. 2009;64(3):441–6.

## POSTUPY PRE PRÍPRAVU ROZTOKOV

### Sterilná destilovaná voda

- Destilovaná voda 1 L
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 20 minút

### Sterilná destilovaná voda ošetrená dietyl pyrokarbonátom (DEPC)

- Destilovaná voda 1 L
- Pridať 0.1% v/v DEPC
- Inkubácia pri 37 °C, cez noc
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 15 minút

### Sterilný fyziologický roztok (0,9%)

- 0.9% (w/v) NaCl
- Rozpustiť v destilovanej vode
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 20 minút

### 40% glukóza

- 40 % (w/v) glukóza
- Rozpustiť v destilovanej vode
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 20 minút
- Po autoklávovaní poriadne premiešať

### 10 x *PBS (phosphate buffered saline)*

- 2 g/L KCl
- 80 g/L NaCl
- 14,4 g/L $Na_2HPO_4$
- 2,4 g/L $KH_2PO_4$
- Rozpustiť v 1 L destilovanej vody
- Upraviť pH na 7,2
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 20 minút
- Po autoklávovaní poriadne premiešať

## POSTUPY PRE PRÍPRAVU ANTIBIOTÍK A ANTIFUNGÁLNYCH LÁTOK

V tejto časti sú uvedené postupy pre prípravu zásobných roztokov jednotlivých antibiotík a antimykotík. Príprava pracovných roztokov je uvedená špecificky v každom cvičení.

**Vankomycín (Vankomycín získaný zo *Streptomyces orientalis*, Merck, Slovensko)**

- Prášok vankomycínu (100 mg) rozpustiť v 2 ml sterilnej destilovanej vody
- Poriadne premiešať
- Pripraviť aliquoty (každá 50 µl)
- Zamraziť pri teplote -20 °C
- Po rozmrazení aliquoty prebytočný roztok vyhodiť

**Amfotericín B (Amfotericín B získaný zo *Streptomyces sp.*, Merck, Slovensko)**

- Prášok amfotericínu B (100 mg) rozpustiť v 2 ml sterilnej destilovanej vody
- Poriadne premiešať
- Pripraviť aliquoty (každá 50 µl)
- Zamraziť pri teplote -20 °C
- Po rozmrazení aliquoty prebytočný roztok vyhodiť

**Flukonazol (Merck, Slovensko)**

- Prášok flukonazolu (100 mg) rozpustiť v 2 ml dimetylsulfoxidu (DMSO)
- Poriadne premiešať
- Pripraviť aliquoty (každá 50 µl)
- Zamraziť pri teplote -20 °C
- Po rozmrazení aliquoty prebytočný roztok vyhodiť

**Kaspofungín – Cancidas (Merck Sharp & Dohme B.V., Holandsko)**

- Prášok kaspofungínu (50 mg) rozpustiť v 2 ml dimetylsulfoxidu (DMSO)
- Poriadne premiešať
- Pripraviť aliquoty (každá 20 µl)
- Zamraziť pri teplote -20 °C
- Po rozmrazení aliquoty prebytočný roztok vyhodiť

## POSTUPY PRE PRÍPRAVU MÉDIÍ

### Sabouraud dextrose agar

- 65 g/L Sabouraud agar
- Rozpustiť v 1 L destilovanej vody
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 15 minút
- Po autoklávovaní poriadne premiešať

### Tekuté YPD (yeast peptone dextrose) médium

- 10 g/L Kvasničný autolyzát
- 20 g/L Bakteriologický peptón
- Rozpustiť v 1 L destilovanej vody
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 20 minút
- Pridať 2 % (w/v) glukózu do média po autoklávovaní a poriadne premiešať

### YPD agar

- 10 g/L Kvasničný autolyzát
- 20 g/L Bakteriologický peptón
- 15 g/L Granulovaný agar
- Rozpustiť v 1 L destilovanej vody
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 20 minút
- Pridať 2 % (w/v) glukózu do média po autoklávovaní a poriadne premiešať

### YPD agar s prídavkom vankomycínu

- 10 g/L Kvasničný autolyzát
- 20 g/L Bakteriologický peptón
- 15 g/L Granulovaný agar
- Rozpustiť v 1 L destilovanej vody
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 20 minút
- Pridať 2 % (w/v) glukózu do média po autoklávovaní a poriadne premiešať
- Ochladiť takto pripravené médium na približne 40 °C
- Pridať vankomycín – výsledná koncentrácia 10 mg/L
- Poriadne premiešať

**0,6 x TSB (tryptic soy broth) médium s prídavkom glukózy**

- 16,5 g/L Bacto Tryptic Soy Broth bez prídavku dextrózy
- Rozpustiť v 1 L destilovanej vody
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 15 minút
- Pridať 0,2 % (w/v) glukózu do média po autoklávovaní a poriadne premiešať

**TSB agar**

- 27 g/L Bacto Tryptic Soy Broth bez prídavku dextrózy
- 15 g/L Granulovaný agar
- Rozpustiť v 1 L destilovanej vody
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 15 minút
- Pridať 2 % (w/v) glukózu do média po autoklávovaní a poriadne premiešať

**TSB agar s prídavkom amfotericínu B**

- 27 g/L Bacto Tryptic Soy Broth bez prídavku dextrózy
- 15 g/L Granulovaný agar
- Rozpustiť v 1 L destilovanej vody
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 15 minút
- Pridať 2 % (w/v) glukózu do média po autoklávovaní a poriadne premiešať
- Ochladiť takto pripravené médium na približne 40 °C
- Pridať amfotericínB – výsledná koncentrácia 8 mg/L
- Poriadne premiešať

**RPMI 1640 - MOPS médium (Roswell Park Memorial Institute medium)**

- 10,4 g práškového RPMI-1640 média (s obsahom glutamínu a fenolovej červene, bez prídavku bikarbonátu)
- Rozpustiť za stáleho miešania v 900 ml destilovanej vody
- Pridať 34,53 g MOPS (kyselina 3-(N-morfolino) propánsulfónová) – výsledná koncentrácia 0,165 mol/L
- Upraviť pH na 7.0 pomocou NaOH za stáleho miešania
- Pridať 100 ml destilovanej vody
- Sterilizovať filtráciou pomocou FAST PES filtrovacej jednotky určenej pre vačšie objemy

**RPMI 1640-MOPS agar**

Príprava tohto média spočíva v dvoch krokoch a to nasledovne:

**Krok A**

- 5,2 g práškového RPMI-1640 média (s obsahom glutamínu a fenolovej červene, bez prídavku bikarbonátu)
- Rozpustiť za stáleho miešania v 450 ml destilovanej vody
- Pridať 17,3 g MOPS (kyselina 3-(N-morfolino) propánsulfónová) – výsledná koncentrácia 0,165 mol/L
- Upraviť pH na 7.0 pomocou NaOH za stáleho miešania
- Pridať 50 ml destilovanej vody
- Sterilizovať filtráciou pomocou FAST PES filtrovacej jednotky určenej pre vačšie objemy

**Krok B**

- 20 g/L glukóza
- 15 g/L Granulovaný agar
- Rozpustiť v 500 ml destilovanej vody
- Upraviť pH na 7.0 pomocou NaOH za stáleho miešania
- Autoklávovať pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa, 15 minút
- Necháme vychladnúť na približne 45 °C – 50 °C

Nasledovne zmiešame zložku A so zložkou B aseptickým spôsobom. Dobre premiešame a vylejeme na Petriho misky. Necháme stuhnúť a skladujeme v chladničke pri teplote 4 °C.

## ZOZNAM SKRATIEK

| | |
|---|---|
| AMB | Amfotericín B |
| AMV | Vírus vtáčej myeloblastózy (Avian Myeloblastosis Virus) |
| CFU | Kolónie tvoriace jednotky (colony forming units) |
| CLSI | Inštitút pre klinické a laboratórne štandardy (Clinical Laboratory Standards Institute) |
| CSLM | Konfokálna Skenovacia Laserová Mikroskopia (Confocal Scanning Laser Microscopy) |
| Ct | Cycle treshold |
| DEPC | Dietyl pyrokarbonát |
| DMSO | Dimetylsulfoxid |
| eDNA | Extracelulárna DNA |
| EUCAST | Európsky výbor pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) |
| h | Hodina |
| IAA | iIsoamyl alkohol |
| KCl | Chlorid draselný |
| $KH_2PO_4$ | Dihydrogénfosforečnan draselný |
| L | Liter |
| MIC | Minimálna inhibičná koncentrácia |
| min | Minúta |
| MFC | Minimálna fungicídna koncentrácia |
| mg | Miligram |
| ml | Mililiter |
| MOPS | Kyselina 3-(N-morfolino) propánsulfónová |
| $Na_2HPO_4$ | Disódiumhydrogén fosfát |
| NaCl | Chlorid sodný |
| NaOH | Hydroxid sodný |
| NCCLS | Národný výbor pre klinické laboratórne štandardy (National Committee for Clinical Laboratory Standards) |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PIA | Polysacharidový intracelulárny adhezín (polysaccharide intercellular adhesin) |
| R | Relative quantity |

| | |
|---|---|
| rpm | Otáčky za minútu |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute médium |
| RT | Izbová teplota |
| RT – qPCR | Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou |
| s | Sekunda |
| SD | Smerodajná odchýlka |
| SEM | Skenovacia Elektrónová Mikroskopia (Scanning Electron Microscopy) |
| TSB | Tryptic soy broth |
| U | Jednotka (unit) |
| VAN | Vankomycín |
| YPD | Yeast peptone dextrose |
| XTT | Sódium hydrát kyseliny 3´-[1- (fenylaminokarbonyl)- 3,4- tetrazolium]-bis (4-metoxy-6-nitro) benzensulfónovej) |