

Lékařská fakulta University Palackého v Olomouci

Ústav biologie

**DRUHOVÁ IDENTIFIKACE PATOGENNÍCH KVASINEK ZALOŽENÁ  
NA ANALÝZE TEPLoty TÁNÍ PRODUKTŮ FINGERPRINTINGU**

Disertační práce

Školitel: MUDr. Vladislav Raclavský, Ph.D.

Olomouc, 2009

Ing. Jitka Trtková

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala především svému školiteli MUDr. Vladislavu Raclavskému, Ph.D. za cenné rady a podněty, které mi při práci poskytl. Dále děkuji Doc. RNDr. Jozefu Noskovi, CSc. za poskytnutí referenčních kmenů a Doc. MUDr. Petrovi Hamalovi, Ph.D. za identifikace kvasinek konvenčními přístupy a poskytnutí podkladů ke karyotypizaci kmenů *C. lusitaniae* a *C. albicans*. Za odbornou pomoc při vývoji programu QAS bych chtěla poděkovat Bc. Petrovi Pavlíčkovi.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM 6198959223).

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla veškerou použitou literaturu a jiné prameny.

V Olomouci dne 15. června 2009

Podpis:

## SOUHRN

Výskyt oslabujících onemocnění, jako jsou AIDS, cukrovka a zhoubné nádory, spolu s rostoucím počtem invazivních zároků vede v posledních desetiletích ke zvýšené míře kolonizace a infekce pacientů různými druhy kvasinek. V poslední době poklesla relativní incidence mykotických infekcí způsobených kvasinkou *Candida albicans*, oproti tomu vzrostl výskyt infekcí způsobených jinými, tzv. non-*albicans* druhy kandid, které se však často výrazně liší v citlivosti k antimykotikům. Přes pokroky v antifungální profylaxi a léčbě zůstává nemocnost a úmrtnost na kandidózu významným klinickým problémem. V případě správné diagnózy v raném stádiu infekce a nasazení odpovídající antifungální terapie se však její prognóza dramaticky zlepšuje.

Přestože byla vyvinuta řada rychlých a citlivých diagnostických systémů, kultivační techniky následované konvenční fenotypovou identifikací čisté kultury stále převažují. Důvodem je, že nekultivační metody, většinou založené na PCR amplifikaci kvasinkové DNA z klinického vzorku, nedokáží pokrýt celé spektrum potenciálně patogenních kvasinek nebo toho dosahují nákladným způsobem.

Nedávno byl v naší laboratoři navržen inovativní přístup k druhové identifikaci kvasinek založený na náhodné amplifikaci polymorfní DNA (RAPD) a analýze křivky tání výsledných amplifikačních produktů (McRAPD). Tento postup na rozdíl od tradiční RAPD nevyžaduje rozřídění produktů gelovou elektroforézou a zdlouhavou a zčásti subjektivní analýzu výsledků v podobě komplexních fingerprintů. Protože jde o univerzální techniku, má McRAPD potenciál pokrýt celé spektrum potenciálně patogenních kvasinek, a to ekonomickým a automatizovatelným způsobem.

Jedním z cílů této práce bylo uzpůsobit metodu McRAPD pro rutinní analýzu klinických vzorků. Bylo prokázáno, že vhodným rychlým a ekonomickým způsobem získání templátové DNA pro McRAPD je zjednodušená extrakční technika používající hrubé lyzáty kolonií. McRAPD protokol byl optimalizován pro použití na přístroji RapidCycler k dosažení co nejnižší vnitrodruhové variability křivek a vysoké reprodukovatelnosti. Následně byla prokázána dobrá opakovatelnost výsledků v rámci jednoho experimentu i mezi experimenty.

V úvodu práce bylo pro vyhodnocení přesnosti identifikace kvasinek pomocí McRAPD vybráno 9 druhů kvasinek v našich podmínkách nejčastěji získávaných z klinických vzorků; použité izoláty byly dříve identifikovány konvenčními postupy v rámci rutinního provozu diagnostické laboratoře Ústavu mikrobiologie LF UP a FN Olomouc. V další fázi byly vždy křivky tání izolátů daného druhu získané McRAPD analýzou srovnány a pro každý pár izolátů byla kvantifikována vzájemná podobnost, což umožnilo



izoláty roztrdit do shluků a definovat jednotlivé McRAPD genotypy. V případě zjištění rozporů ve výsledcích identifikace pomocí McRAPD a konvenčními postupy byla dodatečně provedena identifikace pomocí komerční asimilační soupravy ID 32C. Takto byl získán referenční rámec pro testování správnosti identifikace pomocí různých algoritmů interpretace výsledků McRAPD. Prostý, zcela automatizovaný algoritmus založený na srovnávání normalizovaných křivek tání dokázal správně identifikovat 80 % izolátů. Pokud byl tento algoritmus doplněn korekcí porovnáváním rozhodných píků derivovaných křivek, bylo identifikováno správně 87 % izolátů. Nejlepších výsledků však bylo dosaženo při vizuálním posuzování podobnosti derivované křivky tání s podporou počítače, kdy bylo dosaženo v průměru 98,3 % správně určených izolátů. Z výsledků této části práce vyplývá, že u velké části izolátů vymezené empiricky zjištěným kritériem spolehlivosti by bylo možné použít s vysokou spolehlivostí zcela automatizované vyhodnocení McRAPD. U malé části izolátů nesplňujících kritérium spolehlivosti lze rychlým vizuálním hodnocením derivovaných křivek s podporou běžně dostupného programového vybavení dosáhnout vysoké míry přesné identifikace, která je přinejmenším srovnatelná s fenotypizačními postupy.

Kromě druhové identifikace je pro epidemiologické účely příležitostně požadováno i zhodnocení vzájemné příbuznosti izolovaných kmenů. Schopnost vnitrodruhové typizace McRAPD byla testována na souborech izolátů *C. lusitaniae* a *C. albicans* za méně vyhraněných reakčních podmínek. Z výsledků této části práce vyplývá, že rozlišovací schopnost McRAPD typizace je sice o něco nižší než u karyotypizace, ale její vyhodnocení vylučuje subjektivní faktor, je snadnější a v určitých situacích může poskytovat jednoznačnější závěry.

**Klíčová slova:** *Candida*, druhová identifikace, analýza tání, typizace, automatizace

## SUMMARY

Over the past decades, the occurrence of debilitating diseases such as AIDS, diabetes mellitus and malignancies along with the increasing performing of invasive procedures have been leading to enhanced colonization and infection of patients caused by a variety of yeast species. The incidence of mycotic infections caused by *Candida albicans* yeast has decreased relatively recently, while the incidence of infections caused by other, so-called non-*albicans* *Candida* species, which vary frequently in their susceptibilities to antifungal agents, has risen. Despite advances in antifungal prophylaxis and therapy, morbidity and mortality incurred by candidosis remain a significant burden. However, in case of correct diagnosis and early initiation of appropriate antifungal therapy the prognosis dramatically improves.

Although a vast array of rapid and sensitive diagnostic systems have been developed, cultivation techniques followed by conventional phenotypic identification of pure culture still dominate the field. This is mainly because non-cultivation methods, based predominantly on PCR amplification of yeast DNA from clinical sample, are either unable to cover the whole spectrum of potentially pathogenic yeast species or can do this in a rather costly way.

Lately, an innovative approach to yeast species identification based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) and melting curve analysis of resulting products (McRAPD) has been proposed. In contrast to traditional RAPD, this method omits both gel electrophoresis and tedious and partly subjective analysis of resulting complex fingerprints. Because McRAPD is universally applicable to template DNA of any sequence, it has the potential to cover identification of the whole spectrum of potentially pathogenic yeast species. More so, McRAPD can do it in an economic and automated way.

Tailoring the McRAPD technique to routine analysis of clinical samples was one of the aims of this work. It was demonstrated that crude colony lysates provide a suitable rapid and economic way to obtain template DNA for McRAPD. The McRAPD protocol was optimized to achieve the lowest level of intraspecies variability between curves and high reproducibility when performed on a RapidCycler machine. Good intra-run and inter-run reproducibility of results was verified subsequently.

To evaluate accuracy of yeast species identification based on McRAPD data, 9 yeast species recovered most frequently from clinical samples in our settings were included in the study; their isolates were identified by conventional techniques earlier. Next melting curves of each species acquired by McRAPD analysis were compared and

similarity rate was established numerically for each pair of isolates. This enabled clustering of isolates and delineation of specific McRAPD genotypes. Discrepant results between McRAPD identification and conventional identification were resolved using the ID 32C commercial set of assimilation tests. Hereby a reference frame was obtained for testing of identification accuracy achieved by different algorithms of interpretation of McRAPD data. A simple fully automated algorithm based on comparing of normalized melting data identified 80% of the isolates accurately. When this algorithm was supplemented by the correction by matching of decisive peaks in first derivation plots, 87% of isolates were identified accurately. However, computer-aided visual matching of derivation plots showed the best performance with average 98.3% of accurately identified isolates. These results imply that fully automated McRAPD identification might allow accurate identification of a large part of isolates which would meet an empirically defined reliability threshold. Those isolates which would not meet this threshold can be identified rapidly based on visual matching of derivation plots supported by generally available software, resulting in accurate identification rate at least equal to phenotyping techniques.

In addition to species identification, evaluation of relatedness of isolated strains is occasionally required for epidemiological purposes. The McRAPD capability of intraspecies typing was tested on collection of *C. lusitaniae* and *C. albicans* isolates at less stringent reaction conditions. According to outcomes of this work, the resolution power of McRAPD typing is a little lower compared to karyotyping, however error of bias caused by subjective evaluation of RAPD fingerprints is excluded in McRAPD. Moreover, rather more unequivocal conclusion can be made using McRAPD in certain situations in contrast to karyotyping.

**Key words:** *Candida*, species identification, melting analysis, typing, automation

# OBSAH

<b>I. PŘEHLED PROBLEMATIKY</b> .....	11
<b>I. 1 Lékařsky významné kvasinky</b> .....	11
<b>I. 2 Lékařský význam kvasinek rodu <i>Candida</i></b> .....	12
<b>I. 3 Možnosti léčby kandidózy</b> .....	13
<b>I. 4 Etiologie</b> .....	15
<b>I. 5 Význam non-<i>albicans</i> druhů kandid</b> .....	16
<b>I. 6 Laboratorní diagnostika invazivní kandidózy</b> .....	17
I. 6. 1 Kultivační metody .....	18
I. 6. 2 Nekultivační metody .....	19
I. 6. 2. 1 Sérologické metody .....	19
I. 6. 2. 2 Molekulárně-genetické techniky detekce a identifikace patogenů.....	20
I. 6. 2. 2. 1 Molekulárně-genetické techniky založené na PCR .....	21
I. 6. 2. 2. 1. 1 Výběr cílové sekvence primeru.....	21
I. 6. 2. 2. 1. 2 Příprava vzorku.....	22
I. 6. 2. 2. 1. 3 Detekce a identifikace PCR produktů .....	23
I. 6. 2. 2. 1. 4 Nested PCR.....	24
I. 6. 2. 2. 1. 5 PCR v reálném čase .....	25
I. 6. 2. 2. 2 Molekulárně-genetické techniky založené na jiném principu než PCR .....	28
I. 6. 2. 2. 2. 1 FISH (Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace) .....	28
I. 6. 2. 2. 2. 2 NASBA.....	28
I. 6. 2. 3 Molekulárně-genetické techniky kmenové typizace.....	29
I. 6. 2. 3. 1 Sekvenace.....	30
I. 6. 2. 3. 2 DNA čipy .....	30
I. 6. 2. 3. 3 Elektroforetická karyotypizace.....	31
I. 6. 2. 3. 4 Restrikční analýza (REA) .....	31
I. 6. 2. 3. 5 RAPD (AP-PCR) .....	32
I. 6. 2. 3. 6 AFLP .....	32
<b>I. 7 Využití RAPD (z angl. Random Amplified Polymorphic DNA) pro druhovou identifikaci – alternativní PCR detekce</b> .....	33
I. 7. 1 Vlastnosti reakčních složek RAPD .....	35
I. 7. 1. 1 Primery.....	35
I. 7. 1. 2 Templátová DNA.....	36
I. 7. 1. 3 <i>Taq</i> polymeráza .....	36
I. 7. 1. 4 Hořčnaté ionty .....	37

I. 7. 1. 5 Nukleotidy .....	37
I. 7. 2 Využití denaturace DNA pro analýzu produktů amplifikace.....	37
I. 7. 2. 1 Struktura DNA.....	37
I. 7. 2. 2 Analýza křivky tání .....	38
I. 7. 2. 3 McRAPD (Melting curve of RAPD) .....	40
<b>II. CÍL PRÁCE</b> .....	41
<b>III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	42
<b>III. 1 Materiál</b> .....	42
III. 1. 1 Mikroorganismy .....	42
III. 1. 2 Chemikálie.....	42
III. 1. 3 Pomůcky a přístroje.....	43
<b>III. 2 Metody</b> .....	43
III. 2. 1 Uchovávání klinických izolátů.....	43
III. 2. 2 Kultivace kvasinek.....	44
III. 2. 3 Příprava templátové DNA.....	44
III. 2. 3. 1 „Párátková“ (Toothpick) PCR.....	44
III. 2. 3. 2 Extrakce DNA pomocí YeaStar Genomic DNA komerční soupravy .....	45
III. 2. 4 Příprava PCR směsi .....	45
III. 2. 4. 1 Primer .....	45
III. 2. 4. 2 PCR-fingerprinting pomocí RAPD na přístroji RapidCycler 2 .....	46
III. 2. 5 Elektroforetické dělení produktů amplifikace .....	46
III. 2. 5. 1 Příprava gelu.....	46
III. 2. 5. 2 Nanášení produktů PCR na gel .....	47
III. 2. 5. 3 Analýza fingerprintů .....	47
III. 2. 6 Analýza křivky tání.....	48
III. 2. 7 Zpracování rozdílů v průběhu křivek tání .....	49
<b>IV. VÝSLEDKY</b> .....	50
<b>IV. 1 Převedení protokolu McRAPD na přístroj RapidCycler</b> .....	50
IV. 1. 1 Sestavení reakční směsi.....	50
IV. 1. 2 Uspořádání reakčních podmínek .....	52
<b>IV. 2 Získávání templátové DNA</b> .....	54
<b>IV. 3 Zdroje variability výsledků McRAPD</b> .....	56
IV. 3. 1 Opakovatelnost přípravy hrubých lyzátů pro účely McRAPD identifikace..	56
IV. 3. 2 Vliv změny techniky extrakce DNA na výsledek McRAPD.....	57
IV. 3. 3 Opakovatelnost jednotlivých běhů .....	58
IV. 3. 4 Vliv vnitrodruhové variability.....	59

<b>IV. 4 Výsledky identifikace u zvoleného souboru kmenů</b> .....	61
IV. 4. 1 Definice genotypů .....	61
IV. 4. 2 Vyhodnocení správnosti identifikace pomocí McRAPD – použití různých přístupů.....	63
IV. 4. 2. 1 Automatizovaná identifikace neznámého izolátu na základě přiřazení k druhu s nejméně odlišným průběhem tání .....	63
IV. 4. 2. 2 Dvoukroková identifikace zohledňující píky tání .....	64
IV. 4. 2. 3 Identifikace na základě vizuálního hodnocení podobnosti derivovaných křivek .....	65
<b>IV. 5 Vnitrodruhová typizace významné patogenní kvasinky <i>C. tropicalis</i></b> .....	67
IV. 5. 1 Genotypy <i>C. tropicalis</i> .....	67
IV. 5. 2 Asociace genotypu s citlivostí k antimykotikům .....	68
<b>IV. 6 Rozlišení kryptických druhů <i>C. parapsilosis</i> pomocí McRAPD</b> .....	69
<b>IV. 7 Typizace izolátů <i>C. lusitaniae</i> k potvrzení kmenové identity</b> .....	72
<b>IV. 8 Typizace izolátů <i>C. albicans</i> k potvrzení kmenové identity</b> .....	75
<b>V. DISKUZE</b> .....	80
<b>VI. ZÁVĚRY</b> .....	86
<b>VII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	87
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	101
<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	103

# I. PŘEHLED PROBLEMATIKY

## I. 1 Lékařsky významné kvasinky

Moderní medicína paradoxně vytváří stále větší prostor pro rozvoj infekcí, protože léčením dříve neléčitelných onemocnění umožňuje přežití výrazně oslabených pacientů. Rovněž jsou do praxe zaváděny některé nové postupy, které také usnadňují vývoj infekce. Zjednodušeně lze říci, že v dostatečně oslabeném terénu může infekci způsobit téměř jakýkoli mikroorganismus, schopný základního přežití v prostředí teplokrevného lidského organismu. To platí v plné míře i pro houbové mikroorganismy včetně kvasinek, které jsou typickými oportunními patogeny. K rozšiřujícímu se spektru podmíněných patogenů může přispívat i fakt, že moderní diagnostika umožňuje identifikovat i mnohé vzácné druhy kvasinek, které mohly být dříve přehlíženy. Spektrum potenciálně patogenních kvasinek je proto velmi široké. Historicky byly kvasinky schopné kolonizovat teplokrevné živočichy označovány obecně jako kandidy (*Candida sp.*). U většiny z nich je známo pouze anamorfní stádium neumožňující přesnou klasifikaci tradičními metodami. Podle starší klasifikace se druhy kandid s absencí pohlavního stádia řadily do třídy *Deuteromycetes*. Současná klasifikace se kromě nových znalostí teleomorfních stádií u některých druhů opírá zejména o fylogenetické analýzy genových sekvencí. Na základě srovnávání sekvencí nukleových kyselin byla naprostá většina kvasinek rodu *Candida* zařazena do třídy *Hemiascomycetes*, oddělení houby vřekaté (*Ascomycota*) (Taylor, 1995). Rodové označení *Candida* je proto dnes výhradně používáno pro vřekovýtrusné kvasinkovité mikroorganismy. Ačkoli existuje více než 150 druhů rodu *Candida*, které se vyskytují kosmopolitně ve vodě, půdě, ovzduší, vegetaci i potravinách a velká část z nich byla popsána alespoň vzácně ve spojení s infekčním onemocněním, pouze malá část je schopná způsobit skutečně závažnou infekci (tzv. kandidózu). Z lékařského hlediska je nejvýznamnějším zástupcem *Candida albicans*, následují druhy *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* a *C. glabrata*. K vzácnějším druhům izolovaným z klinického materiálu náleží *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. dubliniensis*, *C. utilis*, *C. guilliermondii* a *C. kefyr* (Calderone, 2002). Další druhy kvasinek jsou izolovány z klinických vzorků velmi vzácně. Vzhledem k tomu, že *C. albicans* je vůbec nejběžnějším houbovým patogenem člověka (Larriba et al., 2000) a představuje až 70 % izolátů v diagnostických laboratořích, rozdělujeme z klinického hlediska někdy rod *Candida* na dvě skupiny: kvasinky *Candida albicans* a tzv. non-*albicans* kandidy (NAC, z angl. non-*albicans Candida*).

Rod *Candida* zahrnuje velmi různorodou skupinu organismů, které mohou v závislosti na podmínkách růst nejen jako oválné či kulaté jednobuněčné pučící buňky

(blastospory) o typické velikosti 2–8  $\mu\text{m}$ , ale většina druhů za určitých podmínek může vytvářet i vláknité formy (pseudohyfy – dceřiné buňky se protahují a neoddělují se od mateřské buňky). *C. albicans* a *C. dubliniensis* dokonce tvoří i pravé hyfy (mycelium). Schopnost morfologické transformace mezi myceliální (vláknitou) a kvasinkovou formou je označována jako dimorfismus. Ukazuje se, že dimorfismus může hrát důležitou, byť ne nepostradatelnou, roli při kvasinkové invazi (Mitchell, 1998). V nepříznivých podmínkách vytváří *C. albicans* a *C. dubliniensis* na koncích a po stranách hyf velké (8 až 12  $\mu\text{m}$ ), tlustostěnné buňky označované jako chlamydo-spory. Kromě morfologických charakteristik se jednotlivé druhy liší také schopností využívat za aerobních a anaerobních podmínek zdroje uhlíku a tvořit extracelulární polysacharidy. Souhrn těchto charakteristik je využíván ke konvenční fenotypové identifikaci.

## I. 2 Lékařský význam kvasinek rodu *Candida*

Kvasinky rodu *Candida* patří k podmíněným patogenům lidí a teplokrevných živočichů. Jako neškodní komenzálové osídlují řadu míst v těle, jsou běžnou součástí mikroflóry zdravých jedinců. Nejčastěji se vyskytují na kůži (především druhy *C. parapsilosis* a *C. guilliermondii*) (Dignani et al., 2003) a na sliznici v dutině ústní, v gastrointestinálním traktu a vulvo-vaginální oblasti. Epiteliální povrchy a výskyt fyziologické flóry, která adhezí obsazuje receptory na sliznicích, za běžných podmínek chrání tělo dostatečně před vstupem tohoto mikroorganismu do vnitřního prostředí. V závislosti na stavu imunitního systému hostitele nebo změně složení normální mikroflóry však kandidy vyvolávají řadu nejrůznějších onemocnění, od povrchových po závažné systémové infekce. Primárním obranným mechanismem hostitele je fagocytóza kandid leukocyty.

Neobvyklou dovednost kandid (zejména *C. albicans*) rychle se adaptovat na nejrozmanitější prostředí v těle, na působení antimykotik, tlak imunitního systému nebo změny ve fyziologii hostitele lze vysvětlit pružnou změnou genové exprese a realizací složitých genetických programů. Při kontaktu s hostitelem často dochází ke změně vlastností kmene. Kromě dimorfismu (viz kap. I. 1) bylo u kandid pozorováno přepínání mezi několika různými fenotypy kolonií na agaru (tzv. phenotypic switching) (Soll, 1992). Jedná se o spontánní vratný jev, který se vyskytuje s vysokou frekvencí a ovlivňuje některé znaky související s virulencí, jako je exprese povrchových antigenů, tvorba hyf, afinita ke tkáním, sekrece proteolytických enzymů, citlivost k lékům a odolnost vůči neutrofilním leukocytům.

Infekce způsobené kandidami mohou mít lokální nebo invazivní charakter, přičemž klinický obraz bývá velmi nespecifický a pestrý. Mezi povrchové formy náleží postižení



nehtového lůžka (onychomykóza); kožní, orofaryngeální (bělavý povlak - soor) a vulvovaginální kandidóza; ezofagitida; a chronická mukokutánní kandidóza. Povrchovými kandidózami trpí především nemocní AIDS, až u 90 % z nich se vyvine jedna z forem onemocnění (Barchiesi et al., 1997; Yang et al., 2006). Vaginální kandidóza postihne alespoň jednou za život přibližně 75 % žen (Carlile et al., 2001). Mnohem závažnější a často i život ohrožující formou onemocnění je hluboká mykóza s postižením orgánů. Zvláště u imunosuprimovaných pacientů, kteří mají rozvráceny obranné systémy, kandidy snadno pronikají hlouběji do tkání. Mohou se pak množit i v krevním řečišti (tzv. kandidémie), odkud mají možnost napadnout téměř jakýkoliv orgán (plíce, játra, ledviny, srdce, oko, CNS) nebo způsobit diseminovanou systémovou infekci, která může vést až ke smrti. Za kandidémii je považována situace, kdy je izolována *Candida* sp. z nejméně jednoho krevního vzorku. Vzhledem k tomu, že je obtížné určit, zda je kandidémie spojena s hlubokou orgánovou kandidózou nebo jde jen o přechodnou formu po zavedení katetru, zahajuje se léčba u imunoalterovaných a kritických pacientů vždy. U zvýšeného počtu katetrizovaných pacientů jsou kandidy nalézány také v moči (tzv. kandidurie).

### I. 3 Možnosti léčby kandidózy

Léčba kandidóz se potýká s řadou problémů, obecně se odvíjí od typu onemocnění a stavu pacienta. Komplikujícím faktorem je omezený výběr dostupných antimykotik. U povrchových kandidóz se osvědčily hlavně místně působící imidazolové preparáty klotrimazol, flukonazol, ketokonazol a polyenové antimykotikum nystatin. U diseminované kandidózy nedostatečné diagnostické možnosti včasného průkazu patogenu limitují nasazování adekvátních antimykotik, což je však pro úspěšnou léčbu či dokonce záchranu života zcela zásadní (Morrell et al., 2005). Drahá systémová antimykotika se tedy nyní podávají převážně preemptivně nebo u těžce nemocných (např. u neutropenických pacientů) dokonce empiricky nebo profylakticky. Preemptivní (ochranná) léčba je formou cílené profylaxe, indikací je nález kolonizace kandidami ve dvou různých lokalitách nebo identifikace *C. tropicalis*. Tyto léčebné přístupy jsou finančně náročné, v případě nepotvrzení diagnózy zbytečně zatěžují pacienta a mohou přispívat k vývoji rezistence na běžná antimykotika. Cílená léčba nasazovaná u pacientů s prokázanou mykotickou infekcí je ale v současnosti zřídka dosažitelným ideálem.

Existují tři hlavní skupiny antifungálních léčiv: polyeny, pyrimidinové analogy a azolové preparáty (imidazoly a novější triazoly). Většina používaných antifungálních léků (polyeny a azoly) je zacílena na biosyntetickou dráhu ergosterolu, který je specifickou složkou cytoplazmatické membrány hub, narušují tedy celistvost buněčných povrchů.

Polyenová makrolidová antibiotika patří mezi přirozené antifungální sloučeniny. Jeden z nejúspěšnějších a nejdéle používaných preparátů z třídy polyenů je amfotericin B produkovaný *Streptomyces nodosus*. Ačkoli se jedná o účinné antimykotikum, které je stále pokládáno za zlatý standard pro srovnávání účinnosti s ostatními antifungálními sloučeninami, léčba je prakticky vždy doprovázena závažnými nežádoucími účinky včetně nefrotoxicity (Ostrosky-Zeichner et al., 2003). Vedlejší účinky lze sice omezit inkorporací amfotericinu B do lipidových nosičů, to ovšem výrobu až 100násobně prodraží. Amfotericin B se doporučuje při léčbě systémových kandidóz a při infekcích způsobených kandidami rezistentními na azoly. Spektrum účinku nezahrnuje *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* (Pfaller et al., 2003) a dokonce některé izoláty *C. albicans* vykazují nízkou citlivost k amfotericinu B (Sanglard et Bille, 2002).

Lék původně vyvinutý proti rakovině, 5-fluorocytosin (5-FC), patří do skupiny pyrimidinových analogů. Blokuje tedy proteosyntézu a zasahuje do syntézy DNA. Kvůli úzkému antimykotickému spektru působení a rychlému vývoji rezistence se 5-FC podává obvykle v kombinaci s dalšími látkami, především amfotericinem B, jehož antimykotický účinek potence a umožňuje tedy snižovat jeho dávkování.

Třetí skupinou antimykotik jsou syntetické sloučeniny azoly. Vzhledem k příznivému profilu vysoké účinnosti a nízké toxicity je lékem volby v případě systémové kandidózy triazolový preparát první generace flukonazol (Anaissie et al., 1996; Vento et Cainelli, 2003). Mnoho NAC druhů bývá ale k azolovým derivátům méně citlivých nebo jsou dokonce rezistentní. *C. krusei* je primárně rezistentní a u *C. glabrata* se rychle vyvíjí sekundární rezistence, což lze vysvětlit haploidním charakterem tohoto organismu. Stále se rozšiřující rezistence k flukonazolu pravděpodobně souvisí se stoupajícím počtem infekcí způsobených těmito druhy i přes včasné zahájení léčby nebo profylaktickou intervenci (Snydman, 2003). Například při profylaxi flukonazolem u neutropenických pacientů často dochází ke kolonizaci *C. krusei*. Obvyklá profylaxe triazoly například může také vysvětlovat zvýšený výskyt *C. dubliniensis* u HIV-pozitivních pacientů, u této kvasinky se totiž velmi rychle vyvíjí stabilní rezistence na flukonazol (Moran et al., 1997).

Protože stávající léky jsou v mnoha ohledech nevyhovující, probíhá vývoj a výzkum dalších terapeutik. Zpřístupnění databáze genomu *C. albicans* nepochybně rozšíří možnosti vyhledávání unikátních genů a jejich potenciální využití jako cílů nových léčiv. Vorikonazol, triazolový derivát další generace s rozšířeným spektrem působnosti, byl nedávno zaveden do praxe. Vorikonazol je indikován jako lék první linie v léčbě kandidové sepse u pacientů bez neutropenie (Haber et Mallátová, 2005). Další triazolový preparát posakonazol se zdá být účinný i proti druhům odolným k jiným triazolům, amfotericinu B nebo echinokandinům. V posledních letech byla vyvinuta nová třída

antimykotik, která se nazývají echinokandiny (Denning, 2003). Ty specificky inhibují glukán syntázu, která katalyzuje syntézu  $\beta$ -glukanu ve stěně hub. Působí i proti triazol-rezistentním kandidám a proti kandidám zapouzdřeným v biofilmech (Eggimann et al., 2003), přesto i na tato novější antimykotika byly již hlášeny případy snížené citlivosti (např. u *C. guilliermondii* a *C. parapsilosis*) (Pfaller et al., 2005). Hlavním zástupcem echinokandinů je kaspofungin, který se nyní doporučuje jako lék první volby pro invazivní kandidózu a kandidémii (Pappas et al., 2004), již jsou dostupné i nově registrované léčivé přípravky s micafunginem a anidulafunginem.

#### I. 4 Etiologie

Kandidóza patří k oportunním mykózám, což znamená, že infekce vzniká u osob oslabených jiným onemocněním nebo s narušenou obranyschopností. Počet imunokompromitovaných pacientů neustále stoupá. Zvyšuje se počet onkologických pacientů po chemoterapii, nemocných s imunosupresivní léčbou, diabetiků, HIV-pozitivních pacientů, pacientů operovaných i ve vysokém věku a předčasně narozených novorozenců s ještě nedostatečnou imunologickou výbavou. Takoví pacienti se stávají snadným cílem pro oportunní patogeny způsobující zejména nemocniční (tzv. nozokomiální) nákazy, včetně mykotických infekcí (Hazen, 1995). Paradoxem nemocničních infekcí je fakt, že jejich riziko stoupá s lékařským pokrokem – čím více nefyziologických zásahů do organismu, tím větší nebezpečí infekce. Velmi časté jsou proto případy na jednotkách intenzivní péče. K rizikovým faktorům v moderních nemocnicích náleží především užívání imunosupresivních a cytotoxických látek, kortikosteroidů, širokospektrých antibiotik, které porušují rovnováhu běžné mikroflóry, neutropenie, a nejruznější invazivní diagnostické a léčebné postupy, které poškozují přirozené obranné bariéry (Hobson, 2003). Jedním z nejvýznamnějších rizikových faktorů pro rozvoj systémové kandidózy bývá kontaminace intravaskulárního katetru (Rex et al., 1995a). Ta bývá zapříčiněna pevnou vazbou kandid na plasty. Biofilmy tvořené komplexem kvasinkových buněk, hyf a extracelulární polymerní hmoty poskytují rovněž kandidám ochranu proti působení léků (Baillie et Douglas, 1999). Nástroje mohou být kontaminovány už před zavedením, ale častěji dochází k zavlečení patogenu z pacientovy kůže nebo rukou zdravotnického personálu (Douglas, 2003).

Nejčastějšími původci nozokomiálních mykóz jsou kvasinky rodu *Candida* (Jarvis, 1995) a jsou též čtvrtou nejčastější příčinou infekcí krevního řečiště (Pfaller, 1994). Kandidy působí dodatečné komplikace k již tak vážnému základnímu onemocnění hospitalizovaného pacienta, úmrtnost v případě kandidémie je proto i navzdory

odpovídající antifungální léčbě velmi varující, míra hrubé mortality se odhaduje na 60 % a přímé na 40 % (Gudlaugsson et al., 2003).

Existují dva rozdílné způsoby přenosu infekce. V prvním případě bývá zdrojem infekce pacientova endogenní flóra. Tento způsob, kdy je pacient napaden kmenem z vlastního rezervoáru po předcházejícím narušení ochranné bariéry, je převažující (Voss et al., 1994). Další možností je kolonizace v průběhu hospitalizace anebo přímá nákaza získaná z nemocničního prostředí (exogenní) skrze kontaminované infúzní roztoky, nástroje a přenos z rukou zdravotnického personálu nebo mezi pacienty navzájem (tzv. cross-infection). Speciálními případy exogenního přenosu jsou u vulvovaginálních infekcí přenos pohlavním stykem a přenos z matky na dítě při porodu nebo v těhotenství.

Nejzávažnějším důsledkem exogenního šíření kandid je vznik miniepidemií na nemocničních odděleních. Kvasinky rodu *Candida* se přenášejí velmi snadno a rychle. Z hlediska nemocničního provozu je důležité identifikovat zdroje infekce a způsoby přenosu těchto patogenů a tím zabránit jejich šíření (Fridkin et Jarvis, 1996). Vyžaduje to přesnou typizaci kmenů, bez které je velmi obtížné rozlišit mezi běžnou kolonizací, relapsem nemoci nebo nozokomiální infekcí.

## I. 5 Význam non-*albicans* druhů kandid

Ačkoli *Candida albicans* je díky vynikajícím schopnostem adheze na hostitelské tkáň a produkci řady hydrolytických enzymů stále považována za nejvirulentnější druh kandid (Naglik et al., 2004), klinický význam ostatních druhů nadále stoupá. Kromě etablovaných kvasinkových patogenů jsou onemocnění navíc způsobena řadou dříve nepatogenních nebo nerozpoznávaných druhů (Wingard, 1995; Collazos et al., 1999). V roce 1990 bylo téměř 80 % kandidémií připisováno *C. albicans* (Nguyen et al., 1996), v novějších epidemiologických studiích (Pfaller et al., 1999) však byla *C. albicans* označena jako původce pouze zhruba poloviny nákaz a je následována *C. parapsilosis* (20–40 % infekcí), *C. glabrata* (5–40 %), *C. tropicalis* (10–30 %), *C. lusitaniae* (2–8 %) a *C. guilliermondii* (1–5 %) (Krcmery et Barnes, 2002). Nárůst infekcí způsobených non-*albicans* kandidami lze vysvětlit všeobecným vzestupem incidence mykóz, selekcí druhů rezistentních na používaná antimykotika a také zčásti zdokonalováním detekčních a identifikačních metod.

Například molekulární a fylogenetické studie pomohly nedávno objevit nový patogenní druh kandid způsobující orální infekce častěji u HIV-pozitivních pacientů, *Candida dubliniensis*, který byl dřívějšími fenotypizačními metodami mylně identifikován jako *Candida albicans* (Sullivan et al., 1995). U tohoto druhu se snadno vyvíjí stabilní rezistence k flukonazolu (Moran et al., 1998). *Candida glabrata* je sice poměrně málo

patogenní, přesto kvůli rychlému rozvoji rezistence na flukonazol i amfotericin B a vysoké úmrtnosti na fungemie způsobené touto kvasinkou náleží mezi obávané patogeny (Fidel et al., 1999). Výskyt *Candida parapsilosis* není tak těsně spojen s člověkem, jako je tomu u dvou předchozích druhů kandid, tato kvasinka má zato několik vlastností, které jí umožňují se šířit v nemocničním prostředí (Girmenia et al., 1996). Osídluje především kůži a velmi často je přenášena na pacienty z rukou nemocničního personálu (Bonassoli et al., 2005). Navíc produkuje extracelulární polysacharid, který napomáhá adhezi na plastové materiály, což může vysvětlit původ infekcí spojených se zaváděním katetru nebo dalších protetických nástrojů (např. umělých chlopní). Naproti tomu infekční kmeny *Candida krusei* bývají endogenního původu, většinou kolonizují trávicí trakt (Pfaller, 1996). Profylaxe flukonazolem, ke kterému je *C. krusei* přirozeně rezistentní, tedy může podpořit její pomnožení s následným průnikem do oběhového systému (Rex et al., 2000). Ve zvýšené míře se proto vyskytuje u pacientů s profylaktickou nebo terapeutickou léčbou flukonazolem. Jelikož *C. tropicalis* je citlivá na používaná antimykotika, její klinický význam ustupuje do pozadí. U imunokompromitovaných pacientů (zejména onkologických) však je mnohem vyšší frekvence invazivních infekcí způsobených tímto druhem než *C. albicans*. Nově na významu naopak nabývá *C. lusitanae*, která je považována za běžnou součást mikroflóry kolonizující zažívací a dýchací trakt. V několika případech byla popsána získaná rezistence *C. lusitanae* na amfotericin B u pacientů, totéž potvrdily pokusy *in vitro* (Yoon et al., 1999). Dokumentovány jsou také případy fungemie způsobené *C. guilliermondii* u onkologických pacientů (Mardani et al., 2000).

Při použití antimykotických přípravků může docházet ke změnám v kmenovém složení kvasinek. Obecně se soudí, že existuje přímá souvislost mezi rutinním užíváním flukonazolu a tím, že relativně ubývá infekcí způsobených *C. albicans* a narůstá incidence kandidóz vyvolaných NAC druhy, především *C. krusei* a *C. glabrata*.

## I. 6 Laboratorní diagnostika invazivní kandidózy

Diagnostika kandidózy skýtá vzhledem k nesespecifické klinické manifestaci řadu překážek, klíčové je srovnání všech dostupných laboratorních dat s dalšími okolnostmi (vliv rizikových faktorů, klinické příznaky). Pro definitivní potvrzení diagnózy je nezbytné laboratorní vyšetření. Současné rutinně používané mikrobiologické techniky však bohužel neumožňují včasné a přesné určení infekčního agens, aby mohla být zahájena adekvátní terapie. Řada případů systémové kandidózy je tedy diagnostikována příliš pozdě na záchranu pacienta a některé případy jsou diagnostikovány až post mortem. Mezi hlavní laboratorní diagnostické přístupy patří kultivace, mikroskopie, histopatologie a sérologie. V poslední době probíhá i snaha o zavedení metod molekulární biologie do rutinní praxe.

Ty by mohly představovat výhodnější alternativu ke konvenčním testům, vzhledem k tomu, že především citlivost a rychlost běžně používaných testů je neuspokojivá.

#### I. 6. 1 Kultivační metody

Současné metody průkazu infekčního agens spořádají na kombinaci morfologických a biochemických znaků. Kandidy jsou grampozitivní, aerobní, růstově nenáročné houby. Rostou v širokém rozsahu pH (od 2 do téměř 8) i za sníženého obsahu kyslíku. Na Sabouraudově půdě narůstají ve formě krémovitých smetanově bílých kolonií s charakteristickým zápachem. Selektivita půdy se zvyšuje přidáním antibiotik pro potlačení bakteriálního růstu, např. chloramfenikolu. Některé druhy (*C. albicans*, *C. dubliniensis*) rostou i v přítomnosti cykloheximidu. Po naočkování se vzorky kultivují při teplotě 25 až 37 °C alespoň 3–5 dnů, než lze prokázat přítomnost nebo nepřítomnost kandid. Druhy nebo i kmeny se mohou lišit jak ve vzhledu kolonií, tak mikroskopicky tvarem a velikostí buněk. Buňky nebo hyfy kvasinek lze snadno pozorovat v mikroskopu s fázovým kontrastem, mikroskopické vyšetření však obvykle umožňuje pouze jejich orientační popis.

Směsné izoláty některých medicínsky významných druhů lze předběžně izolovat a rozlišit podle barvy kolonií na růstovém médiu obsahujícím chromogenní substrát (CHROMagar, Candida ID, Albicans ID, apod.). Druhy *C. albicans* a *C. dubliniensis* lze vcelku jednoduše a rychle identifikovat podle tvorby zárodečných klíčků (tzv. germ tubes), což se zajišťuje buď naočkováním izolátu do séra nebo sklíčkovou mikrokulturou na půdě s Tweenem 80. Klíčky vyrůstají z blastospor po 2–4 hodinové inkubaci a posléze se z nich tvoří pravé hyfy. Vzácně byla popsána tvorba zárodečných klíčků také u *C. tropicalis*, ale liší se od zárodečných klíčků *C. albicans* zúžením na začátku (Tierno et Milstoc, 1977). *C. albicans* a *C. dubliniensis* také typicky tvoří během 2–3 dnů chlamydospory na nutričně chudých půdách (kukuřičný nebo rýžový agar). Nejčastěji se vyskytující *C. albicans* je tedy možné od ostatních druhů rychlými a jednoduchými testy odlišit poměrně snadno. Rutinní diagnostické laboratoře v naprosté většině případů rezignují na identifikaci *C. dubliniensis*, protože její odlišení od *C. albicans* může mít potenciální klinický význam jen u velmi úzkého spektra pacientů.

Jednotlivé druhy kandid se liší fermentací cukrů, asimilací zdrojů uhlíku a dusíku a rezistencí vůči antibiotikům. Podrobnější druhové určení je tedy možné na základě biochemických charakteristik pomocí testů fermentace (zymogram) nebo asimilace různých zdrojů uhlíku (auxanogram) (Freydiere et al., 2001). Pro mykologické laboratoře jsou dnes dostupné různé komerční soupravy (API ID 32C, API 20C AUX, Auxacolor, Candifast a další), což identifikaci standardizuje a usnadňuje. Omezujícím faktorem je

však jejich cena, nutnost předchozí izolace kvasinky a doba potřebná pro stanovení nejméně 48 hodin (Buchaille et al., 1998). Komerční testy navíc často nejsou vhodné pro detekci méně běžných druhů. Například *C. famata* je tímto způsobem nerozlišitelná od *C. guilliermondii*, v tomto případě je nutná podrobná morfologická diskriminace vyžadující zhruba 10 dní (Dignani et al., 2003). Kolorimetrický test na detekci L-prolin aminopeptidázy a  $\beta$ -galaktosamidázy (BactiCard Candida) je vhodný na rychlou předběžnou identifikaci *C. albicans*, která jako jediná produkuje oba enzymy.

Kandidová sepe se prokazuje aerobní hemokultivací. Po naočkování vzorku do kultivační nádoby s médiem je sledována pomocí automatizovaných systémů pro kultivaci krevních kultur (např. BacT/Alert, Bactec, ESP) hladina CO<sub>2</sub> nebo změna v redox potenciálu při růstu mikroorganismů. Citlivost kultivace je málo uspokojivá, krevní kultury u neutropenických pacientů bývají pozitivní v méně než 50 % případů (Berenguer et al., 1993). Navíc je nutná následná subkultivace, aby byla získána čistá kultura potřebná pro definitivní určení druhu. Přínosné pro průkaz invazivní kandidózy je histologické vyšetření vzorku tkáně s nálezem kvasinek a hyf, odběr vzorku však může být pro některé pacienty příliš zatěžující.

## I. 6. 2 Nekultivační metody

### I. 6. 2. 1 Sérologické metody

Mikroorganismy se mohou lišit antigenními determinanty exprimovanými na buněčném povrchu nebo produkovanými metabolity. V posledních desetiletích bylo vyvinuto široké spektrum nekultivačních metod detekce kandid, zahrnující detekci protilátky proti kandidovým antigenům (např. proti enoláze, mananu a heat shock proteinu 90), detekci cirkulujících antigenů (sekretované aspartátové proteázy, manan, enoláza) nebo detekci některých specifických metabolitů, příp. složek buněčné stěny, chemickými metodami (D-arabinitol, manóza nebo (1→3)- $\beta$ -D-glukan). Využívá se buď latex-aglutinačních testů nebo značně citlivých imunoenzymatických metod (EIA, z angl. Enzyme ImmunoAssay). Pro dosažení maximální citlivosti sérologických metod je velmi důležité provádět časté odběry vzorků, ideálně denně.

Při detekci protilátek proti kandidovým antigenům hrozí riziko falešně pozitivních výsledků, jelikož titr protilátek může být vysoký i u zdravých jedinců kolonizovaných kandidami, naopak falešně negativní výsledky se vyskytují u imunosuprimovaných pacientů s nedostatečnou protilátkovou odpovědí. Jako výhodnější se tedy jeví detekce antigenů. Polysacharid manan je specifický pro kandidy, bohužel je rychle vyplavován z oběhu (Yeo et Wong, 2002) a jeho detekce samozřejmě neumožňuje druhovou

identifikaci. Marker (1-3)- $\beta$ -D-glukan jako běžná složka buněčné stěny hub slouží pouze k průkazu jakékoliv probíhající mykotické infekce. Pozitivní výsledek vykazuje až 90 % pacientů se systémovou mykózou, slabou stránkou metody je až 12 % falešně pozitivních výsledků (Yeo et Wong, 2002). D-arabinitol je metabolitem některých druhů kandid, který se hromadí v moči pacientů s invazivní kandidózou. Bohužel test má nízkou citlivost a nedetekuje vůbec *C. krusei* a *C. glabrata* (Pasqualotto et Denning, 2005). Navíc jeho stanovení vyžaduje nákladné přístroje, nejčastěji plynový chromatograf, k rozlišení lidského (L) a houbového (D) enantiomeru. Poměr arabinitolů může kolísat i v souvislosti s nedostatečnou funkcí ledvin (Reiss et al., 2000). Enoláza je cytoplazmatickým antigenem, který se uvolňuje do krve v průběhu invazivní infekce. Její detekce se zdá být nejlepším řešením, protože je vysoce specifická pro kandidy, vyvolává silnou protilátkovou odpověď a test není pozitivní při samotné povrchové kolonizaci. Pro nízkou citlivost je ale nutné vyšetření provést vícekrát. Pomocí nových latexových aglutinačních testů využívajících monoklonální protilátky je možné odlišení *C. dubliniensis* od *C. albicans* a identifikace *C. krusei* během několika málo minut (Fumouze Diagnostics).

Oproti tradičním kultivačním metodám jsou sérologické metody mnohem rychlejší, bohužel však obvykle nejsou schopné rozlišit druh kvasinky (Pontón et al., 2002) a interpretace výsledků bývá nejednoznačná, mají proto diskutabilní využití. Nedostatky jednotlivých metod lze kompenzovat kombinací testů a opakovaným odběrem vzorků.

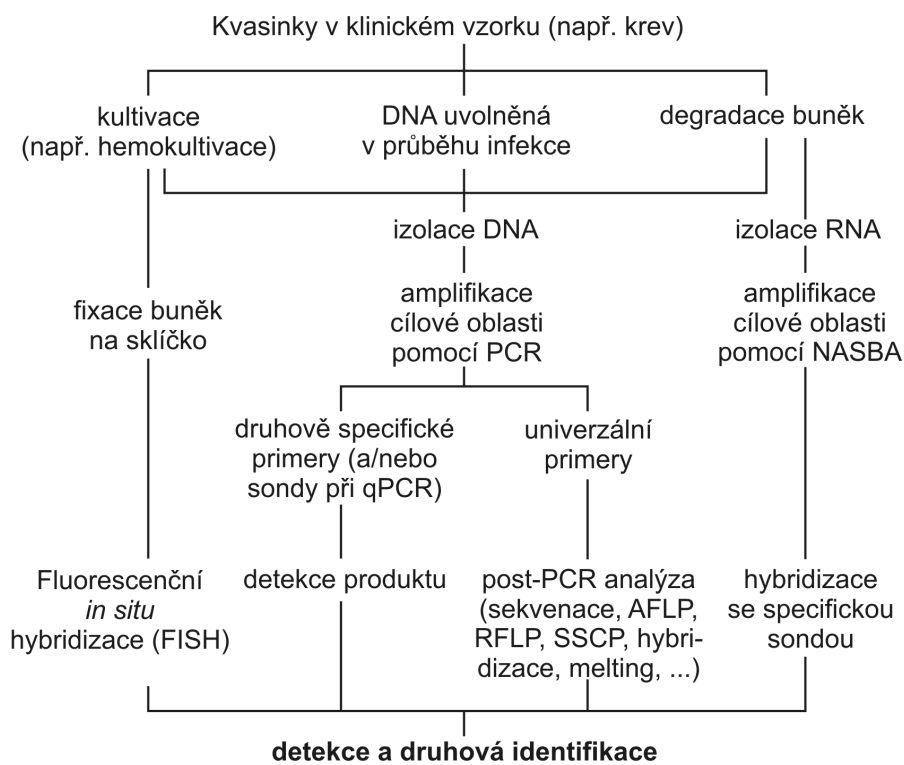
#### I. 6. 2. 2 Molekulárně-genetické techniky detekce a identifikace patogenů

Je známo, že fenotypové vlastnosti mohou být sdíleny různými druhy kvasinek a naopak se liší u různých izolátů téhož druhu v závislosti na kultivačních podmínkách nebo stáří kultury. Proto byla od 70. let vyvíjena široká škála genotypových metod usilujících o přesnou a rychlou identifikaci pomocí srovnávání rozdílů na genetické úrovni (Obr. 1). Detekuje se přítomnost určité sekvence nukleové kyseliny, specifické pro konkrétní typ patogena. Druhá identifikace je často při vhodném nastavení experimentu možná i jen na základě detekce. Pro účinnou terapii je přínosná nejen rychlá diagnostika kandidózy, ale i odlišení *C. albicans* od ostatních druhů s odlišným profilem antibiotické citlivosti.

Molekulárně-genetické techniky prodělávají stále intenzivní vývoj, proto většinou ještě nejsou k dispozici obecně akceptované a standardizované postupy nebo komerčně dostupné soupravy. Zavádění těchto technik do běžné praxe má nesporný přínos pro zkvalitnění diagnostiky, vhodně doplňují detekci antigenu sérologickými metodami a tím zvyšují pravděpodobnost včasného záchytu původců mykóz v klinickém materiálu. Mikrobiologické laboratoře bohužel pro tento účel nemají často dostatečné vybavení, potřebné oddělené prostory a vyškolený personál. Každou metodu je také nutné



optimalizovat a ověřit na velkém souboru druhů. Další překážkou může být nákladnost metod a nízká informovanost klinických pracovníků, která často vede k přehnaným očekáváním.



Obr. 1 – Přehled molekulárně-genetických technik detekce a identifikace patogenů

#### I. 6. 2. 2. 1 Molekulárně-genetické techniky založené na PCR

##### I. 6. 2. 2. 1. 1 Výběr cílové sekvence primeru

Od devadesátých let minulého století byla na základě znalosti genomové sekvence kandid publikována řada oblastí DNA, které jsou využitelné k detekci těchto patogenů metodou PCR. Jestliže se zaměříme na druhově specifické sekvence, PCR umožní vysoce specifickou detekci pouze jednoho žádaného druhu patogenního mikroorganismu. Naproti tomu zacílení na univerzální (panfungální) sekvence společné širšímu spektru mikroorganismů umožní detekci jakékoliv houbové DNA ve vzorku, což vyvrátí nebo potvrdí podezření na houbovou infekci. Vybrány mohou také být rodově specifické oblasti z genomu kandid. V posledních dvou jmenovaných případech je pak pro následnou druhovou identifikaci nutná další charakterizace PCR produktu (viz kap. I. 6. 2. 2. 1. 3).

Pro zajištění vysoké citlivosti detekce by měly být voleny přednostně geny, vyskytující se v genomu v mnoha kopiích. Pro diagnostiku systémové kandidózy se nejvíce osvědčilo zacílení na oblast genů pro rRNA. Jedná se o tandemové opakování

50 až 100 kopií genu kódujícího ribozomální RNA. Tato oblast se skládá z genu pro malou podjednotku rRNA (18S), genu pro 5,8S rRNA a genu pro velkou podjednotku rRNA (25S), které jsou odděleny tzv. vnitřními přepisovanými mezerami ITS1 a ITS2 (z angl. Internal Transcribed Spacer). Oblast byla velmi rozsáhle prostudována fylogenetickými analýzami a ukázalo se, že zatímco rRNA geny jsou u hub vysoce konzervované, ITS oblasti obsahují vysoce variabilní sekvence, což umožňuje navržení primeru pro detekci druhovou, rodovou i panfungální (Fell et al., 1992; Reiss et al., 1998). Také oblasti D1 a D2 na 5'-konci genu pro velkou podjednotku rRNA poskytují možnost zacílení druhově specifických primerů (Mannarelli et Kurtzman, 1998). Genová rodina sekretovaných aspartátových proteáz (SAPs) představuje další skupinu sekvencí, které mají početnější zastoupení v genomu kandida a mohou sloužit jako cíl pro PCR amplifikaci (Flahaut et al., 1998). Také lze detekovat některý z genů, které se v genomu vyskytují v jediné kopii (single-copy). Příkladem může být gen kódující cytochrom P450 dependentní lanosterol-14 $\alpha$ -demethylázu (L1A1) (Burgener-Kairuz et al., 1994). Enzym je rozšířen u všech hub, katalyzuje konverzi lanosterolu na ergosterol, který je nezbytnou součástí plazmatické membrány hub (Buchman et al., 1990). Mezi sekvence specifické pouze pro kvasinky rodu *Candida* patří geny kódující aspartyl proteázu (Flahaut et al., 1998), chitin syntázu (Jordan, 1994), aktin (Kan, 1993) nebo heat shock protein 90 (Crampin et Matthews, 1993).

#### I. 6. 2. 2. 1. 2 Příprava vzorku

Pro zdárný průběh PCR je třeba kromě výběru cílové sekvence pečlivě zvolit druh klinického vzorku, ze kterého se bude templátová DNA získávat, a také metodu extrakce nukleových kyselin. PCR může být aplikována teoreticky na jakýkoliv tkáňový vzorek pacienta se systémovou kandidózou, s naprostou převahou se však využívá krevních vzorků. Získat z lidské krve dostatečné množství čisté houbové DNA pro detekci však může být poměrně náročné. Krev totiž obsahuje značné množství hostitelské DNA, která může interferovat s hybridizací primerů i s vlastní amplifikací a navíc mnoho složek krve působí jako inhibitory *Taq* polymerázy (Maaroufi et al., 2004). Výhodou přístupů založených na PCR je, že dokáží zjistit přítomnost i neživotoschopných patogenních buněk a postačí pro ně minimální množství výchozího materiálu.

V klinickém vzorku se kromě intaktních kvasinkových buněk může vyskytovat i nahá DNA uvolněná rozpadem mrtvých buněk kvasinek. Z intaktních buněk je možné DNA s vyšší účinností uvolnit pouze po předchozím narušení buněčné stěny. U hustých suspenzí buněk přicházejí v úvahu různé postupy (mechanické narušení skleněnými kuličkami, tření v tekutém dusíku nebo prosté působení vysoké teploty). V případě

klinických vzorků s nízkou koncentrací kvasinkových buněk je ovšem možné aplikovat pouze enzymatickou degradaci nejlépe inkubací se směsí glukonáz (např. Zymolyáza) a proteinázou K.

Na rozrušení buněčné stěny mohou obecně navázat dva postupy získání čisté DNA – tradiční fenol-chloroformová extrakce nebo adsorpce na silikátový povrch. Fenol-chloroformová extrakce je založena na odstranění bílkovin a lipidů, po kterém následuje etanolová precipitace a rozpuštění DNA ve vodném roztoku. Tento postup je pracný, zdouhavý a vyžaduje použití toxických chemikálií. Extrakce DNA zejména pomocí komerčně dostupných souprav (kitů) je proto zajištěna adsorpcí nukleových kyselin na silikát v přítomnosti chaotropních solí. Ostatní sloučeniny z roztoku se snadno odstraní odmytím obvykle přes kolonku s filtrem zachycujícím silikátové částice. Kity jsou vhodné zejména k rutinní extrakci DNA z velkého množství uniformních klinických vzorků, proces lze i automatizovat v robotické stanici. Pro laboratoře s větším průtokem vzorků je jistě velkou úsporou pracovních sil automatický izolátor, který produkuje vysoce čistou DNA (např. MagNA Pure LC systém, Roche Diagnostics) (Loeffler et al., 2002).

#### I. 6. 2. 2. 1. 3 Detekce a identifikace PCR produktů

Mnohé z PCR postupů umožňují identifikaci jen jednoho druhu na základě specifických sekvencí. Pokud je PCR založena na amplifikaci variabilního úseku DNA pomocí univerzálních primerů (tzv. panfungální PCR), existuje řada postupů charakterizace produktu PCR, kterými lze následně rozlišit různé rody a druhy. Tyto postupy mohou rovněž v některých případech zvyšovat citlivost a/nebo specifitu analýzy. Variabilita produktu může být vyšetřena jedním z následujících postupů:

- Posouzení délkového polymorfizmu produktů gelovou elektroforézou v tradičním horizontálním uspořádání v agaróze nebo nověji v polyakrylamidu v kapiláře. Kapilární elektroforéza je mnohem přesnější a automatizovaná, speciální přístrojové vybavení ovšem nebývá obvykle v mikrobiologických laboratořích k dispozici (Chen et al., 2000).
- Hybridizace s druhově specifickými značenými sondami. Pro detekci každého druhu je nutné použít zvláštní sondu, což je nákladné a pracné (Sandhu et al., 1995). Postup lze automatizovat ve formátu mikrotitrační destičky s pomocí techniky EIA (Elie et al., 1998; Coignard, 2004) nebo real-time PCR (viz kap. I. 6. 2. 2. 1. 5). Zjednodušení postupu také přináší reverzní hybridizace, do testovacích stripů lze inkorporovat sondy pro řadu významných druhů kandid (Martin et al., 2000). V budoucnu by též mohlo být elegantním řešením použití technologie DNA čipů (tzv. microarrays), kdy se fluorescenčně značené produkty PCR hybridizují

s rodově a druhově specifickými oligonukleotidy vázanými do matice na pevný povrch (Leinberger et al., 2005).

- Nejdokonalejší charakterizaci produktu samozřejmě nabízí přímé sekvenování (Pryce et al., 2003; Leaw et al., 2006). Ačkoli jsou už dostupné komerční automatizované systémy (Hall et al., 2003), je tento postup pro běžné rutinní použití stále příliš pracný a vyžaduje nákladné specializované zařízení. Tuto nevýhodu by mohly částečně překonat alternativní technologie, které byly v poslední době vyvinuty (např. pyrosekvenování) (Gharizadeh et al., 2004).
- Nízkonákladový přístup spočívá v enzymatickém restričním štěpení produktů amplifikace a elektroforetickém rozlišení délkového polymorfizmu štěpných úseků (tzv. PCR-RFLP). Bohužel se jedná o postup časově náročný (Morace et al., 1997; Dendis et al., 2003).
- Metoda analýzy konformačního polymorfizmu jednovláknové DNA (tzv. SSCP) je založena na tom, že už změna jediné báze v cílové sekvenci může způsobit změnu konformace jednovláknových DNA molekul, které se pak liší elektroforetickou mobilitou. PCR produkt se denaturuje a rychle ochladí, aby se předešlo opětovnému spojení řetězců, ty se posléze separují elektroforeticky v nativním polyakrylamidovém gelu. Pro zdlouhavé provedení vyžadující větší odborné znalosti metoda nenašla zatím širší využití (Walsh et al., 1995; Hui et al., 2000).
- Produkty je možné charakterizovat také na základě rozdílných teplot tání (podrobnější vysvětlení viz kap. I. 7. 2. 2).

#### I. 6. 2. 2. 1. 4 Nested PCR

Uhnížděná (angl. nested) PCR se využívá ke zvýšení specifity a citlivosti PCR detekce. Skládá se ze dvou samostatných následných amplifikačních reakcí. V první PCR se použijí vnější primery, které umožní amplifikaci rozsáhlejší oblasti. Produkty z této reakce pak slouží jako templát další reakce, ve které pomocí vnitřních primerů dojde k namnožení pouze dílčího úseku sekvence amplifikované vnějšími primery. Jestliže při první reakci mohly být na základě určité míry shody se sekvencí primerů minoritně nasyntetizovány i jiné než žádané oblasti (tzv. nespecifické produkty), tyto nejsou účinně amplifikovány v další reakci, neboť je velmi málo pravděpodobné, že by uvnitř těchto nespecifických produktů vnitřní primery opět našly alespoň částečně komplementární úseky a opět nasedly. Tím je zvýšena specifita reakce oproti klasické PCR. Současně vzroste také citlivost reakce díky opakované amplifikaci části produktu z první reakce. Dvoukolové uspořádání PCR lze s výhodou využít v diagnostice houbových patogenů.

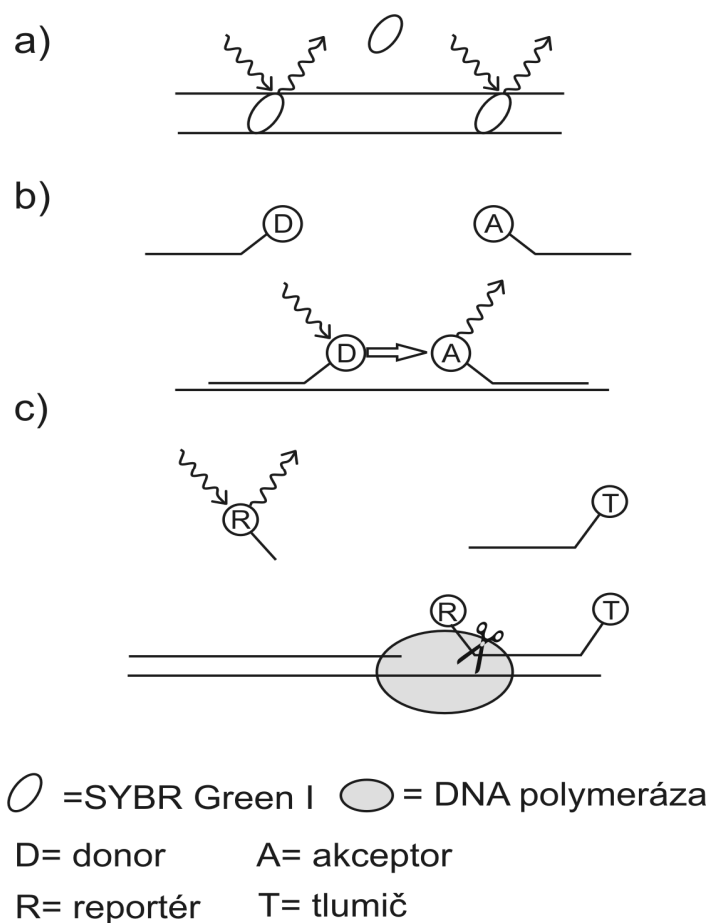
Důmyslnost postupu tkví v kombinaci univerzálních panfungálních primerů v prvním kole amplifikace s druhově specifickými primery v druhém kole. Jelikož provádění samostatných reakcí s jednotlivými páry specifických primerů je poněkud pracné a nákladné, je možné sdružit některé primery do směsi, která dovoluje provedení druhého kola souběžně (tzv. multiplexová PCR). Použití nested PCR pro druhovou detekci kandid demonstrovali např. Bougnoux a kol. (1999) a Kanbe a kol. (2002), ani nejlepší systémy ale nedokážou pokrýt celé spektrum patogenních kandid. Extrémně vysoká citlivost metody přináší i nevýhody. Kvůli manipulaci s produkty prvního kola při sestavování reakční směsi pro druhé kolo je reakce velice náchylná ke křížové kontaminaci vzorků a falešné pozitivitě (Louie et al., 2000).

#### I. 6. 2. 2. 1. 5 PCR v reálném čase

Velmi perspektivní a v poslední době široce využívanou variantou PCR je tzv. PCR v reálném čase (angl. real-time PCR). Využívá fluorescenční reportérové molekuly k vizualizaci produkce amplikonů v průběhu každého cyklu PCR. To je základní rozdíl oproti běžné PCR (tzv. end-point PCR), u které lze výsledek hodnotit až po skončení reakce. Křivka množení produktu vždy končí esovitým plató, bez ohledu na vstupní množství templátové DNA. Důvodem je inhibice dalšího množení produktu, způsobená především interferencí hromadícího se produktu s nasedáním primeru. U end-point PCR nelze tedy určit množství vstupní templátové DNA. V lékařské mykologii je tato informace cenná především v případech, kdy množství detekované DNA patogena koreluje se závažností infekce nebo odezvou na léčbu. Tuto překážku bylo možné překonat až s vývojem kombinace moderního termocykleru s integrovaným fluorimetrem (Wittwer et al., 1997). Ten zaznamenává fluorescenci reakční směsi v reálném čase a díky vysoce efektivnímu mechanismu výměny tepla umožňuje navíc značně zkrátit časový interval potřebný k získání výsledku. Zkrácení doby denaturace šetří aktivitu *Taq* polymerázy a zkrácení doby přechodu mezi jednotlivými teplotami snižuje interferenci renaturace produktu s nasedáním primeru, takže je možné provádět PCR až v 50 cyklech se zvýšenou výtěžností a tedy i citlivostí ve srovnání s konvenčním uspořádáním. Amplifikace i detekce probíhá v téže uzavřené reakční kapiláře nebo mikrozkuhavce, což redukuje možnost křížové kontaminace produktem na minimum.

Real-time termocyklery v průběhu PCR ozařují vzorek excitačním zářením, které vybudí fluorescenci reportérové molekuly. Proces amplifikace lze monitorovat dvěma způsoby, v obou případech je množství emitované fluorescence úměrné množství PCR produktu. Tuto fluorescenci po každém cyklu přístroj zaregistruje a předá řídicímu softwaru. První a jednodušší způsob je užití interkalačního barviva (např. SYBR Green,

LC Green, BEBO, BOXTO), které emituje záření až po navázání k dvouvláknové DNA, kdežto volné molekuly barviva v roztoku vykazují zanedbatelnou fluorescenci (Obr. 2a). To ale přináší komplikaci tím, že je také detekována nežádoucí vazba na dimery primerů a nespecifické produkty a nelze specificky detekovat více různých produktů současně. Pro lepší charakterizaci produktů a zajištění vyšší specifity je proto vhodné amplikony podrobit analýze křivky tání (Ririe et al., 1997). Odlišným přístupem je využití fluorescenčně značených oligonukleotidových sond (např. FRET sondy, TaqMan sondy, Molecular Beacons sondy, Scorpions sondy). Sonda musí být navržena tak, aby hybridizovala s templátovou DNA za stejných podmínek jako primery a nasedala do cílové oblasti mezi místy nasednutí obou protisměrně orientovaných primerů, což zvyšuje specifitu. Intenzita fluorescence je obecně závislá na množství amplifikované DNA, na kterou se sonda váže. Detekce je možná např. díky rezonančnímu přenosu energie (FRET, z angl. Fluorescence Resonance Energy Transfer) z donorového na akceptorový fluorofor, ke kterému dochází, pokud sondy nasednou v těsné blízkosti (Wilhelm et Pingoud, 2003) (Obr. 2b). Detekce je také možná díky na míře amplifikace závislému odstranění zhášení fluorescence reportérového fluoroforu tlumičem (uspořádání TaqMan, obr. 2c).



Obr. 2 – Způsoby detekce běžně užívané při real-time PCR: a) interkalační barvivo, b) hybridizační FRET-sondy, c) sondy TaqMan. Princip je blíže vysvětlen v textu.

Navzdory vysokým počátečním pořizovacím nákladům a prozatím nedostatečné standardizaci se metoda PCR v reálném čase nepochybně v budoucnu stane nepostradatelnou pro diagnostické mykologické laboratoře pro svou jedinečnou reprodukcibilitu, rychlost, citlivost a potenciál k analýze velkého počtu klinických vzorků. Bylo již provedeno několik studií na detekci kvasinek rodu *Candida* se zacílením genový komplex rRNA s využitím PCR v reálném čase (Hsu et al., 2003; Pryce et al., 2003; Selvarangan et al., 2003; White et al., 2003). Lze také využít toho, že fluorescenční barviva s rozdílnými emisními spektry mohou být navázána na různé sondy, což umožní amplifikaci a detekci několika genů a/nebo druhů v jedné reakční směsi (tzv. multiplex). Náklady na syntézu specifických sond však rostou přímo úměrně počtu specificky rozlišovaných druhů a optimalizace takto komplexních reakcí vedoucí k uspokojivé specifitě i senzitivitě bývá obtížná. Bu a kol. (2005) popsali detekci a kvantifikaci DNA pěti druhů hub v multiplex real-time PCR uspořádání.

Drtivá většina metod založených na PCR je vyvíjena v laboratořích vlastními silami, ale pomalu se začínají prosazovat i komerční identifikační soupravy. Real-time PCR kit (LC *Candida* Kit M, Roche Diagnostics) je určený pro rychlou detekci *C. albicans* a test SeptiFast (Roche Diagnostics) slouží jako pomůcka k detekci 25 a identifikaci 20 nejčastějších druhů bakterií a hub (z kvasinek *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* a *C. glabrata*) způsobujících infekce krevního oběhu bez nutnosti kultivace (Lehmann et al., 2008).

K zajímavým výsledkům dospěl tým Nikkari a kol. (2001) při real-time PCR zacílené na konzervované sekvence rRNA genů bakterií. Vzorky krve od zdravých dobrovolníků byly v pokusu srovnávány s negativní kontrolou a pozitivní kontrolou se známým obsahem bakteriální DNA. V negativní kontrole vždy vznikl produkt amplifikace stejně jako ve vzorcích krve dobrovolníků, kde ovšem docházelo k amplifikaci v dřívějších cyklech, což značí vyšší hladinu DNA. Při univerzální PCR často v negativní kontrole dojde k namnožení produktu, zdrojem kontaminující DNA bývají běžné komerční reagenty. Ačkoliv je krev považována za sterilní prostředí, je známo, že v organismu může docházet k tzv. přechodné sepsi. Pokus poukazuje na možnost, že se DNA nebo i celé mikroorganismy (McLaughlin et al., 2002) uvolňují z běžné mikroflóry (např. při čištění zubů; Lucas et al., 2008), dostávají se do krve a vytváří jakési běžné „DNA pozadí“. Podobný jev byl pozorován i při real-time PCR kandid (Maaroufi et al., 2003).

## I. 6. 2. 2. 2 Molekulárně-genetické techniky založené na jiném principu než PCR

### I. 6. 2. 2. 2. 1 FISH (Fluorescenční *in situ* hybridizace)

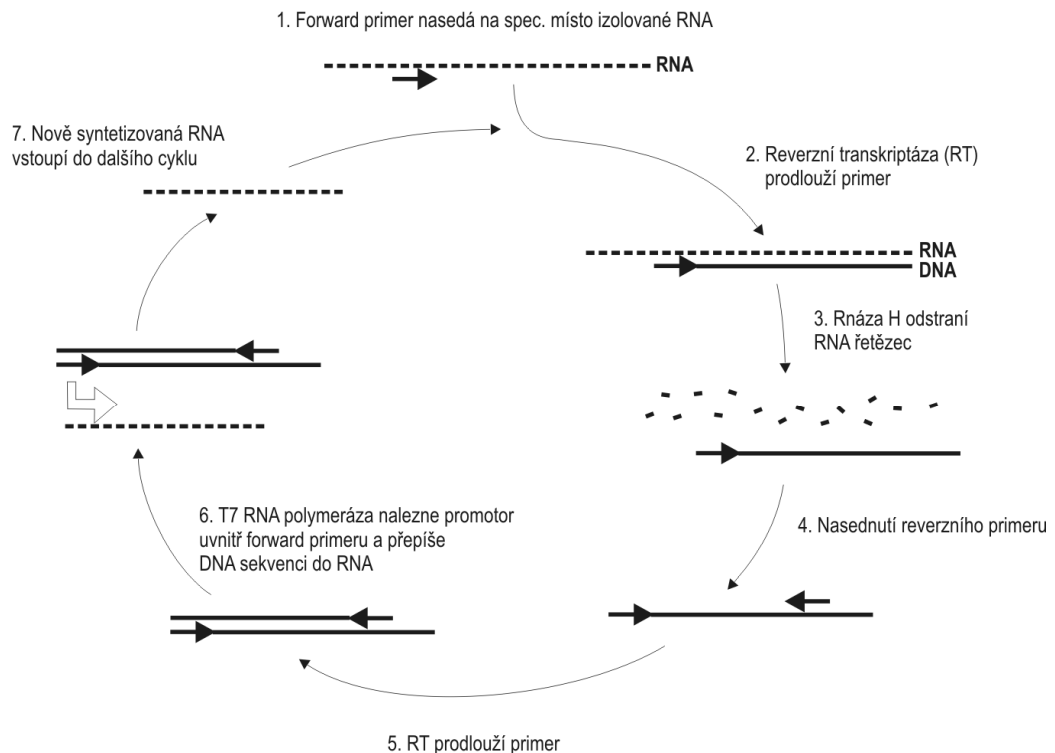
Tato metoda užívá fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy k detekci kvasinek *in situ* bez nutnosti izolace čisté kultury ze vzorku tkáně či tělních tekutin. Sonda lze hybridizovat přímo ke krevnímu nátěru nanesenému z hemokultivační nádoby na sklíčko, poté co se materiál zafixoval a vystavil denaturačním podmínkám. Nenačnané sondy se odmyjí a pomocí fluorescenčního mikroskopu se prokáže přítomnost mikroorganismu ve vzorku. Využití nových vysoce afinitních PNA sond (z angl. Peptide Nucleic Acid) spolu se zacílením na oblast rRNA genů rozšířilo potenciál této metody. Vzhledem k jednoduchosti postupu, který obchází izolaci DNA, lze díky PNA FISH detekovat kvasinky již za 2,5 hodiny po odběru vzorku z krevní nádoby, celý proces lze navíc snadno automatizovat. FISH, která využívá sondy specifické pro jednotlivé druhy kandid, se zdá být citlivou a specifickou metodou pro druhovou identifikaci (Kempf et al., 2000). Experimenty prokázaly, že lze spolehlivě zachytit již tři buňky kvasinek v 0,5 ml krve, takže je tato metoda při kombinaci s hemokultivací v podstatě citlivostí i časovou náročností obdobná PCR (Lischewski et al., 1997). Byla vyvinuta metoda FISH pro odlišení *C. albicans* od NAC druhů a její použitelnost v praxi byla ověřena multicentrickou studií (Wilson et al., 2005, Alexander et al., 2006). Detekce kvasinek pomocí FISH je výhodná především při vyšetřování pozitivních hemokultivačních nádobek (Rigby et al., 2002).

### I. 6. 2. 2. 2. 2 NASBA

Zajímavou alternativou k PCR pro detekci kvasinek se jeví technologie NASBA (z angl. Nucleic Acid Sequenced Based Amplification). Jedná se o velmi rychlou, specifickou a citlivou izotermickou cyklickou amplifikaci RNA s cDNA jako meziproductem (Compton, 1991; Kievits et al., 1991). Primery jsou zacílené do konzervované oblasti genu pro 18S rRNA lékařsky významných hub. Ohraničená sekvence je množena pomocí směsi tří enzymů: reverzní transkriptázy, Rnazy H a T7 RNA polymerázy (Obr. 3) a identifikována značenými sondami navrženými na vnitřní sekvence specifické pro daný patogen. Metoda již byla uzpůsobena k identifikaci šesti různých druhů rodu *Candida* (Loeffler et al., 2003). Amplifikace RNA je výhodná, protože RNA je na rozdíl od DNA mimo buňky rychle degradována a jsou tedy detekovány výhradně živé buňky. V buňce je RNA přítomna v mnohonásobně větším počtu kopií než DNA, což přispívá k citlivosti stanovení (1 CFU/ml) (Widjoatmodjo et al., 1999). Právě vzhledem k vysoké citlivosti metody a všudypřítomnosti hub je největším nedostatkem metody NASBA nebezpečí



kontaminace. Limitujícím faktorem pro rozšíření techniky je prozatím vysoká cena směsi enzymů, oproti tomu náklady na laboratorní vybavení nejsou vysoké, protože není potřeba pořizovat termocykler.



Obr. 3 – Postup jednotlivých kroků metody NASBA

### I. 6. 2. 3 Molekulárně-genetické techniky kmenové typizace

Rozlišení jednotlivých kmenů v rámci daného druhu kvasinek je možné jen na základě podrobnější charakterizace. Nezbytnou podmínkou kmenové typizace je získání čisté kultury klinického izolátu. Genotypizace je oproti klasické fenotypizaci mnohem spolehlivější, protože je založena na analýze genetické informace. Ta obecně vykazuje větší variabilitu než fenotypové charakteristiky a zároveň se nemění v závislosti na podmínkách prostředí. Typizace se využívá pro epidemiologické analýzy, umožňuje např. (i) odlišení opakované infekce endogenním kmenem od infekce novým kmenem z prostředí, příp. od ošetřujícího personálu, (ii) sledování vývoje populace patogenů v regionálním i globálním měřítku, (iii) studium mikroevoluce kmene, (iv) zjišťování genetických zvláštností, např. analýza mechanismu vývoje rezistence na antimykotika apod. Genotypizace čistých kultur samozřejmě umožňuje nejen rozlišení kmenů, ale také spolehlivou druhovou identifikaci.

Existuje řada přístupů, které se snaží postihnout sekvenční polymorfizmy kmenů nebo klonů. Avšak stejně jako v případě metod rychlé identifikace a detekce kvasinek žádná z nich dosud nebyla akceptována jako standardní. Pro studium mohou být použity metody přímé, při nichž se přímo stanovuje sekvence variabilní oblasti DNA, což je však zdlouhavé a nákladné. Častěji se tedy používají nepřímé metody, kterými lze zobrazit určitou od variability sekvence odvozenou charakteristiku kmene, obvykle rozložení molekul DNA charakteristické velikosti po rozdělení elektroforézou v podobě pruhů (bandů), pro které se historicky vžil termín "otisk prstů" (angl. fingerprint). Fingerprint může vzniknout elektroforetických dělení celých chromozomů, restričních fragmentů nebo produktů PCR. Čím více polymorfizmů je zahrnuto do srovnání, tím je dosaženo větší rozlišovací schopnosti, proto se často pro ověření výsledků doporučuje kombinovat více metod typizace.

#### I. 6. 2. 3. 1 Sekvenace

Jediným nezpochybnitelným způsobem srovnání dvou kmenů nebo klonů je samozřejmě sekvenování jejich celých genomů. Pro náročnost tohoto postupu se však v praxi využívá sekvenace pouze vybraných genů. Srovnáváním sekvence vhodně vybraného genu lze identifikovat jednotlivé druhy (Coleman et al., 1997). Pokud však zahrneme do analýzy více lokusů, zvýší se rozlišovací schopnost, což umožní i kmenovou typizaci (Botterel et al., 2001). Pro účely standardizované typizace umožňující globální epidemiologické studie jsou v poslední době vyvíjena schémata tzv. MLST (z angl. Multi Locus Sequence Typing), která se zaměřují na vyhledání individuálních polymorfizmů SNP ve vnitřních fragmentech typicky šesti až osmi housekeepingových genů. Výsledky jsou mezilaboratorně reprodukovatelné, lze je ukládat a porovnávat s dalšími sekvencemi v globální referenční databázi (<http://www.mlst.net>) (Aanensen et Spratt, 2005). Bounoux a kol. (2002) studovali potenciální přínos MLST pro charakterizaci klinických izolátů *C. albicans*. MLST systém pro kmenové rozlišení byl již vyvinut také pro *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *C. dubliniensis* (Tavanti et al., 2005a; Odds et Jacobsen, 2008). Naproti tomu MLST typizace u *C. parapsilosis* není možná pro malou mezikmenovou sekvenční diverzitu.

#### I. 6. 2. 3. 2 DNA čipy

Mikročipy nabízejí možnost zpracování velkého množství vzorků s vysokou citlivostí a specifitou. Ohromné množství oligonukleotidových sond reprezentujících část nebo celý genom daného organismu se imobilizuje s vysokou hustotou na pevný povrch a použije k hybridizaci s DNA příslušného kmene, která musí být předem označena.

Komplementární sekvence ze vzorku se váží pevněji k sondám a poskytují silnější signál než nedokonale spárované sekvence. Výsledný signál automaticky detekuje a zaznamenává laserový skener s vysokým rozlišením spojený s počítačem. Mikročipy zjistí velmi pohotově mezikmenové sekvenční rozdíly u mnoha genů současně, zajímavé je také nasměrování typizace na rozpoznávání přítomnosti a kvantity určitého souboru genových polymorfizmů. Je pouze otázkou času, kdy se podaří lépe zvládnout statistické zpracování velkého objemu dat a snížit cenu vývoje čipů, pak mikročipy mohou velmi dobře posloužit k mikrobiálnímu fingerprintingu (Bodrossy et Sessitsch, 2004).

#### I. 6. 2. 3. 3 Elektroforetická karyotypizace

Většina druhů hub vykazuje polymorfismus v délce chromozomů v důsledku nevyrovnaných chromozomových přestaveb nebo chromozomových zlomů a následných oprav (Zolan, 1995). Tento polymorfismus lze sledovat pomocí elektroforetické karyotypizace využívající speciální variantu elektroforézy. Při běžné elektroforéze totiž fragmenty větší než zhruba 50 kb mají stejnou mobilitu a zůstávají nerozdělené, přičemž chromozomy kvasinek jsou mnohem větší. Technika pulzní gelové elektroforézy (PFGE) se využívá k separaci větších intaktních molekul DNA (např. chromozomů) nebo jejich makrorestrikčních fragmentů pomocí elektrického pole s měnícím se směrem. Aby se mohly molekuly DNA pohybovat ve směru změněného elektrického pole, musí nejdříve změnit svou orientaci. Větší molekuly DNA potřebují na reorientaci více času a jejich výsledný přímočarý pohyb je proto pomalejší. Požadavku dělení velkých intaktních molekul DNA je nutné uzpůsobit i metodu izolace DNA, aby nedocházelo k mechanickému nalámání chromozomů. Lýza buněk, deproteinace DNA a případná restrikce vzácně štěpící restrikční endonukleázou se tedy provádí přímo v bločcích agarózy, které se následně vloží do startovních jamek dělicího gelu a vystaví působení elektrického pole. Velikosti chromozomů jednotlivých kmenů kandid se mohou značně lišit, takže získáme rozdílné rozložení pruhů (karyotyp), které se hodnotí vizuálně nebo se softwarovou podporou. Přes nákladné přístrojové vybavení, omezenou kapacitu, zdoluhavou přípravu vzorku a obtížnou interpretaci je tato typizační metoda poměrně oblíbená (Magee et Magee 1987; Monod et al., 1990).

#### I. 6. 2. 3. 4 Restrikční analýza (REA)

Rozdíly podmíněné různou délkou a počtem restrikčních fragmentů vytvořených štěpením genomové DNA určitou restrikční endonukleázou se označují jako délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP, z angl. Restriction Fragment Length Polymorphism). Dříve byla tato metoda známá spíše jako REA (restrikční endonukleázová

analýza). Výše uvedené rozdíly lze jednoduše detekovat gelovou elektroforézou. Výsledné spektrum pruhů ukazuje mezikmenové rozdíly, které jsou výsledkem polymorfismu restrikčních míst nebo důsledkem delecí a inzercí mezi místy rozpoznávanými příslušnou restrikční endonukleázou. Metoda REA je levná, technicky nenáročná, rychlá, ale spektrum produktů je často příliš komplexní pro objektivní srovnávání. Běžnou elektroforézu lze tedy doplnit Southernovou hybridizací se značenou specifickou sondou, která selektivně zviditelní jen vybranou část restrikčních fragmentů. Pro studium kvasinek byly úspěšně aplikovány sondy odvozené z repetitivního elementu RPS, např. Ca3 nebo 27A sonda (Anderson et al., 1993; Boccia et al., 2002), nebo sekvence odvozené od mikrosatelitů (Sullivan et al., 1993), které se zaměřují na restrikční fragmenty vykazující vysokou variabilitu.

#### I. 6. 2. 3. 5 RAPD (AP-PCR)

PCR s náhodnými primery (AP-PCR) neboli náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD) je jednoduchá metoda vhodná pro rychlou a ekonomickou typizaci genomové DNA. V klinické mykologii je proto velmi široce používána (Lehmann et al., 1992; Lin et al., 1995; Liu et al., 1996; Holmberg et Feroze, 1996). Nevyžaduje předchozí znalost sekvencí a je proto vhodná i k typizaci větších souborů méně probádaných mikroorganismů. Blíže je princip metody popsán v kapitole I. 7.

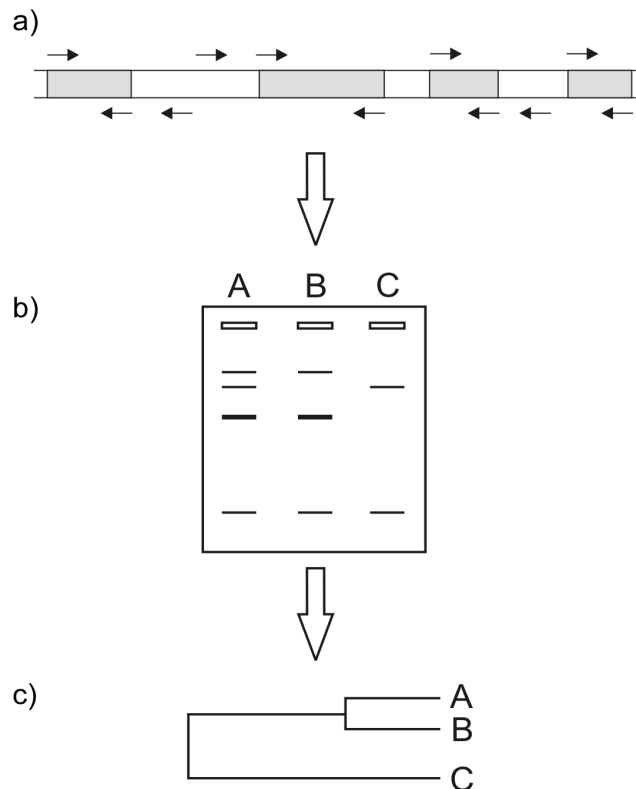
#### I. 6. 2. 3. 6 AFLP

Metoda v podstatě kombinuje REA s AP-PCR, resp. RAPD. Je založena na detekci délkového polymorfismu amplifikovaných restrikčních fragmentů (z angl. Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos et al., 1995). V prvním kroku je genomová DNA štěpena dvěma různými endonukleázami a ke koncům vzniklých restrikčních fragmentů se připojí oligonukleotidové adaptory známé sekvence. Následně jsou restrikční fragmenty podrobeny PCR amplifikaci za použití dvou primerů, které jsou komplementární k sekvenci adaptoru a restrikčního místa. Ke zvýšení selektivity se navíc připojují na 3'-konec primeru jeden až tři náhodně zvolené nukleotidy. Tím dojde k amplifikaci pouze určité podmnožiny restrikčních fragmentů, u kterých se 3'-konec primeru dokonale pároval. Produkty PCR se pak dělí v polyakrylamidovém gelu, typický AFLP fingerprint se skládá z 50–100 pruhů. Zdokonalením metody je využití fluorescenčního značení primerů, dělení kapilární elektroforézou a snímání fluorescenčního signálu rozdělených produktů na automatickém analyzátoru. Podobně jako RAPD a RFLP nevyžaduje AFLP metoda předchozí znalost sekvence zkoumaného vzorku, má však lepší rozlišovací schopnost a reprodukovatelnost. Ze spektra restrikčních fragmentů totiž vybírá pouze část a vyrovnává

kvantitativní zastoupení jednotlivých fragmentů, resp. signálů, následnou amplifikací. Nejprve se metoda uplatnila v mikrobiologii při typizaci bakterií (Lin et al., 1996), později při identifikaci patogenních kvasinek rodu *Candida* (Borst et al., 2003) a také při typizaci původců kandidových infekcí u dětí po transplantaci kostní dřeně (Ball et al., 2004).

### **I. 7 Využití RAPD (z angl. Random Amplified Polymorphic DNA) pro druhovou identifikaci – alternativní PCR detekce**

Původní metodické publikace zveřejnily nezávisle na sobě dvě vědecké skupiny pod názvem AP-PCR, resp. RAPD (Williams et al., 1990; Welsh et McClelland, 1991). Jedná se o techniku PCR-fingerprintingu, která typicky používá jeden krátký primer (nejčastěji dlouhý 10 bází) k amplifikaci za tzv. nevyhraněných (nestringentních) podmínek nasedání (nižší teplota, vyšší koncentrace hořčnatých iontů). Sekvence primeru je navržena náhodně, bez znalosti cílové sekvence. To činí tuto metodu velmi populární, neboť nepotřebujeme znát nukleotidovou sekvenci templátové DNA zkoumaného organismu. Nejprve jsou testovány soubory oligonukleotidů nahodilé sekvence a vybrány jsou ty, které vykazují optimální výtěžnost reakce a rozlišovací schopnost fingerprintů. Vzhledem ke své krátké sekvenci se RAPD primer váže za nevyhraněných podmínek na mnoho cílových míst v genomu, přesto je tato vazba na cílové sekvenci závislá. Jestliže dvě molekuly primeru nasednou na základě komplementarity bází na templátovou DNA ve správné protisměrné orientaci dostatečně blízko sebe, aby mohla proběhnout PCR, vzniká produkt o délce úseku DNA vymezeného místy nasednutí primerů. Při nízké teplotě nasedání (běžně méně než 40 °C) nemusí být komplementarita mezi bázemi primeru a templátovou DNA úplná, takže dochází nečástečně k částečně chybnému párování mezi bázemi (tzv. mismatch pairing). Pokud se dva kmeny liší v sekvenci určitého místa nasednutí primeru, vede to ke zvýšení nebo snížení stability vazby primeru, která by se v případě specifické PCR projevila typicky jen snížením nebo zvýšením výtěžnosti reakce. V případě RAPD spolu ale o nasednutí primeru soutěží mnoho potenciálních cílových míst s podobnými sekvencemi, takže změna sekvence určitého místa typicky vede buď k jeho vyřazení v konkurenci s ostatními, nebo naopak k posílení jeho úspěšnosti na úkor jiných potenciálních míst nasednutí. Výsledkem RAPD je tedy komplexní směs délkově definovaných amplikonů, jejíž složení je částečně kmenově specifické a částečně druhově specifické. Rozdíly se vizualizují gelovou elektroforézou a vzniklá rozložení pruhů jsou softwarově analyzována a srovnávána. Princip RAPD typizace je znázorněn na obrázku 4.



Obr. 4 – Schéma RAPD typizace; a) amplifikace, b) elektroforetické dělení RAPD produktů, c) dendrogram sestavený na základě srovnání fingerprintů kmenů A, B a C.

RAPD vyniká mezi molekulárními metodami svou jednoduchostí, univerzálností, poměrně vysokou rozlišovací schopností a nízkými náklady. Větší důraz by ovšem měl být kladen na provedení této metody, jinak už malé rozdíly v podmínkách experimentu vyústí v odlišné rozložení pruhů, což výrazně omezuje mezilaboratorní reprodukovatelnost. Intenzita nebo přítomnost jednotlivých pruhů je kromě rozdílů v sekvenci vyšetřované genomové DNA ovlivněna mnoha dalšími faktory, např. koncentrací hořčičku, poměrem množství primeru a nukleové kyseliny, zdrojem a koncentrací *Taq* polymerázy, modelem termocyklu, apod. (Meunier et Grimont, 1993; Penner et al., 1993; Tyler et al., 1997). RAPD aplikovaná na eukaryotní organismy se zdá být mnohem reprodukovatelnější vzhledem k vyšší stabilitě jejich genomu (Tyler et al., 1997). Aby se problémům s reprodukovatelností předešlo, je možné PCR zacílit na specifické sekvence a použít vyhraněnější podmínky (Shemer et al., 2001).

Vzhledem k použití nespecifických primerů schopných amplifikovat jakoukoli DNA hrozí při RAPD typizaci kvasinek výskyt produktu v negativní kontrole, přičemž zdrojem mohou být mikroorganismy z prostředí nebo produkty předcházející amplifikace. Opakovaně byly také popsány případy kontaminace houbovou nebo bakteriální DNA u komerčních reagentů, nejčastěji lytických enzymů a *Taq* polymerázy (Schmidt et al., 1991; Hughes et al., 1994; Loeffler et al., 1999; Rimek et al., 1999). Aby se snížilo riziko

kontaminace na minimum, provádí se izolace DNA i příprava reakční směsi v laminárních boxech, které umožňují aseptickou práci. Pracuje se pouze s mikropipetami určenými k tomuto účelu a s jednorázovými špičkami s filtrem, které zachycují aerosol a brání tak křížové kontaminaci vzorků. Důležitá je také prostorová separace jednotlivých kroků PCR a post-PCR analýzy a pravidelné ošetřování těchto prostor UV zářením.

Templátovou DNA pro RAPD analýzu je nutné izolovat z čisté kultury mikroorganismu, protože při izolaci například z krve je pravděpodobné, že bude obsahovat kontaminující lidskou DNA, která může rovněž sloužit jako templát pro RAPD. Vždy se doporučuje provedení tzv. negativní kontroly, která je připravena za stejných podmínek a ze stejných reagensů jako reakční směs testovaných vzorků s tím rozdílem, že místo templátové DNA obsahuje odpovídající objem sterilní deionizované vody. Je možné, že amplifikované produkty objevené v negativní kontrole vznikají na podkladě nepatrného množství kontaminující DNA, takže přidání velkého množství testované DNA do reakční směsi zajišťuje, že toto svého druhu „pozadí“ vlastně neovlivňuje amplifikaci u vzorků (Meunier et Grimont, 1993).

Byla již popsána řada různých primerů poskytujících reprodukovatelné druhově specifické fingerprinty (Lehmann et al., 1992; Liu et al., 1996; Thanos et al., 1996; Steffan et al., 1997; Melo et al., 1998; Bautista-Munoz et al., 2003). Opakovaně bylo prokázáno, že metoda je vhodným nástrojem pro druhovou identifikaci kvasinek, její dostupnost bohužel omezuje požadavek na specializovaný software a odbornost obsluhy.

## I. 7. 1 Vlastnosti reakčních složek RAPD

### I. 7. 1. 1 Primery

Primery používané v metodě RAPD jsou navrhovány bez znalosti konkrétní sekvence templátové DNA. Proto je nutné vyzkoušet vhodnost určité sady připravených primerů pro tvorbu fingerprintů zkoumaného organismu. Jsou vybrány takové primery, které dávají soubor produktů přiměřené komplexity a mají požadovanou rozlišovací schopnost. Kromě použití primeru absolutně náhodné sekvence existuje řada možností využití primeru navrženého podle konkrétní sekvence templátové DNA. Tyto postupy se využívají především pro detekci polymorfizmů v repetitivních sekvencích (např. oblast mikrosatelitů).

V současné době se používají kratší primery o délce 10 až 12 bp, jako minimum se doporučuje 9 nukleotidů a obsah G + C vyšší než 40 % (Williams et al., 1990). Delší primery se většinou nepoužívají, nepřináší totiž pro RAPD žádné významné výhody a vzhledem k počtu nukleotidů je jejich syntéza nákladnější. Na rozdíl od klasické PCR je

nutné u RAPD analýzy používat výrazně nižší teplotu nasedání primeru (angl. annealing temperature), standardně se pohybuje mezi 30 a 45 °C. Kdybychom použili klasicky vypočtenou hodnotu teploty nasedání primeru, zřejmě bychom neobdrželi žádný produkt (Welsh et McClelland, 1990), protože výskyt míst komplementárních s jedním primerem v přiměřené vzdálenosti a vhodné orientaci není pravděpodobný. Obvykle se optimum koncentrace primeru pohybuje mezi 0,3 až 10 µM, je nutné jej určit empiricky.

#### I. 7. 1. 2 Templátová DNA

Intenzita či přítomnost pruhu produktu je přímo závislá na jeho množství. Jednou z příčin, které ovlivňují množství amplifikátu, je koncentrace templátové DNA. Z tohoto hlediska má RAPD semikvantitativní charakter. Tato skutečnost také ukazuje na výjimečný vliv koncentrace templátové DNA na finální výsledek analýzy. Je tedy vhodné stejně jako v případě primerů nejdříve otestovat vliv různých koncentrací templátové DNA na kvalitu výsledného fingerprintu. Tímto postupem pak můžeme vyloučit ty pruhy, které významně závisejí na koncentraci templátu. Změny v koncentraci templátové DNA mohou výrazně ovlivnit výsledek RAPD typizace, neboť s koncentrací se mění množství dokonale komplementárních míst pro nasednutí primeru, výskyt vzácně se amplifikujících míst i četnost špatných párování. Na druhou stranu bylo ověřeno, že reprodukovatelných výsledků RAPD lze dosáhnout i s hrubým lyzátem jednotlivých kolonií (Steffan et al., 1997). Většina aplikací používá mezi 5 až 50 ng templátové DNA na 20 µl reakční směsi.

Pro standardní klinická vyšetření není požadována tak vysoká čistota izolované DNA jako je tomu např. u genetického mapování. Především je nezbytné zbavit se inhibitorů *Taq* polymerázy. Dále je důležité, aby nebyla DNA nadměrně mechanicky poškozena, mohlo by dojít k narušení v místě, které má být amplifikováno.

#### I. 7. 1. 3 *Taq* polymeráza

Přestože se jedná o termostabilní enzym, při teplotách nad 90 °C ztrácí *Taq* polymeráza část své aktivity, není proto efektivní zvyšovat počet cyklů nad cca 45. Pro svou činnost vyžaduje hořčnaté a draselné ionty. Řada látek může tento enzym inhibovat, na což je třeba brát zřetel již při volbě metody extrakce templátové DNA. Inhibici například způsobují některé složky krve, které se musí při izolaci pečlivě odstranit, nebo laurylsíran sodný (SDS), proto je vhodnější použít jiný detergent. Ačkoli *Taq* polymeráza optimálně pracuje při 72 °C, má nízkou aktivitu i při pokojové teplotě, a proto může ihned po přidání do reakční směsi produkovat celou řadu nespecifických produktů. Negativních následků se můžeme částečně vyvarovat tím, že připravujeme reakční směs na ledu. Druhou možností je aplikace tzv. hot start techniky. Ta spočívá v tom, že *Taq*



polymeráza začne být aktivní až v přesně požadovaném okamžiku. Toho lze dosáhnout tím, že použijeme speciálně upravenou polymerázu, která se aktivuje až při teplotě 95 °C, protože je např. blokována termolabilní protilátkou nebo proteinovým ligandem.

#### I. 7. 1. 4 Hořčnaté ionty

Ionty hořčíku nesespecificky stabilizují interakci mezi primerem a templátovou DNA a současně jsou kofaktorem DNA polymerázy. Potřebná koncentrace se opět určuje empiricky, pohybuje se mezi 1–6 mM. Snížením koncentrace hořčíku by se mělo docílit snížení komplexnosti spektra RAPD produktů.

#### I. 7. 1. 5 Nukleotidy

K syntéze nového vlákna DNA musí být ve směsi pro PCR všechny čtyři stavební kameny (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), jinak by reakce neprobíhala. Běžně se používá koncentrace každého z nukleotidů 0,2 mM, vyšší koncentrace mohou vést k chelataci hořčíku a také zvyšují množství chyb při syntéze DNA. Již milimolární množství může vést k inhibici *Taq* polymerázy v důsledku nadbytku substrátu (Galfland, 1989).

### I. 7. 2 Využití denaturace DNA pro analýzu produktů amplifikace

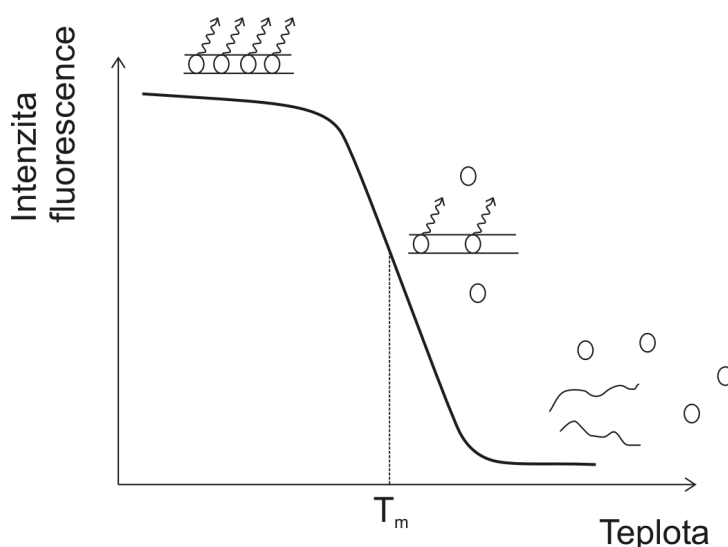
#### I. 7. 2. 1 Struktura DNA

Molekula DNA je tvořena dvěma polynukleotidovými řetězci spojenými vodíkovými můstky, které vznikají mezi protilehlými nukleotidy obou vláken. Páry A–T jsou spojeny dvěma vodíkovými můstky, páry G–C třemi můstky. Dvojvlákno je nejčastěji prostorově uspořádáno do podoby dvojité šroubovice. Struktura je stabilizována nejen vodíkovými můstky, ale významně také interakcemi mezi planární strukturou sousedících dvojic nukleotidů. Na povrchu dvoušroubovice se vytvářejí dvě prohlubně, tzv. menší a větší žlábk, které slouží k interakci s proteiny. Vysokomolekulární DNA „taje“ dokonale až při teplotě kolem 95 °C. Dochází přitom k rozpletení řetězců a vzniku konformace náhodného klubka. K částečné vratné disociaci vláken však dochází už při nižší teplotě, přičemž části molekuly bohaté na A/T páry disociují díky slabší vazebné síle přednostně. Dlouhé PCR produkty obvykle mají více domén tání, zatímco krátké produkty tají naráz. Celá struktura koordinovaně denaturuje (kooperativně se hrouť) náhle až po dodání určité tepelné energie. Tento jev je charakterizován specifickou teplotou tání ( $T_m$ ), při níž je 50 % DNA jednořetězcové. Teplota tání je závislá na délce fragmentu DNA, jeho sekvenci a obsahu GC bází (SantaLucia et al., 1996). Na rozdíl od gelové elektroforézy tedy analýza tání

rozliší i produkty stejné délky, pokud mají rozdílný poměr GC/AT bází, a dokonce i produkty lišící se jen rozložením GC párů v sekvenci.

### I. 7. 2. 2 Analýza křivky tání

Interkalující fluorescenční barvivo (např. SYBR Green I – SG) se váže do DNA dvoušroubovice, přičemž se jeho fluorescence se touto vazbou podstatně zvýší. V roztoku naopak fluoreskuje nepatrně. Těto vlastnosti se využívá pro průběžné monitorování amplifikace DNA při kvantitativní PCR v reálném čase. Při použití SG následná analýza křivek tání nabízí také možnost identifikace a charakterizace produktu na základě jeho specifické teploty tání. Průběžné zaznamenávání procesu denaturace zachytí rychlý pokles fluorescence blízko bodu tání (Obr. 5).



Obr. 5 – Prudký pokles fluorescence blízko bodu tání způsobený uvolňováním interkalačního fluorescenčního barviva v důsledku denaturace DNA

Křivka tání se měří po závěrečné extenzi PCR, nejprve se vzorek ochladí na relativně nízkou teplotu a poté pomalu zahřívá až nad předpokládanou teplotu denaturace DNA. Fluorescenční signál po celou tuto dobu klesá, největší pokles nastává v úzkém teplotním rozmezí. Tento prudký pokles je způsoben kooperativním dějem při rychlé denaturaci DNA. Pro přehlednější zobrazení průběhu denaturace lze data vynášet do derivovaného grafu jako závislost záporně vzaté první derivace fluorescenčního signálu ( $-dF/dT$ ) na teplotě ( $T$ ). Fluorescenční signál nejprve soustavně mírně klesá se stoupající teplotou. V okamžiku denaturace rozsáhlých oblastí DNA ze šroubovice na náhodné klubko pak fluorescence dramaticky poklesne. To se projeví v derivovaném výnosu jako pík, jehož vrchol odpovídá teplotě tání  $T_m$ . Pokud jsou řetězce DNA při vysokých teplotách

již zcela denaturovány, probíhá se stoupající teplotou dále jen mírný pokles fluorescence. Bylo zjištěno, že teplota tání se může měnit v závislosti na koncentraci DMSO, hořčíku, templátové DNA, fluorescenčního barviva a na rychlosti teplotních přechodů při analýze tání (Ririe et al., 1997). Ve většině studií se využívá rychlost přechodu 0,3 °C/s jako kompromis mezi rychlostí a přesností analýzy.

Je známo, že různé DNA fragmenty mohou mít překrývající se profily tání a nelze tedy rozhodnout, zda jde o jeden či více produktů. Delší fragmenty mohou mít uvnitř sekvence více domén tání a poskytují tedy složité křivky. Na druhou stranu krátké produkty PCR obvykle dávají křivku tání s jediným píkem, ale překvapivě nezřídka i komplexnější křivky (Li et al., 2003). Sekvence se skupinami A/T nebo G/C bohatých oblastí totiž pozměňují konformaci DNA a tím i možnost vazby interkalačního barviva.

Přesný způsob vazby SG na nukleové kyseliny stále není objasněn, částečně také proto, že struktura a koncentrace komerčních fluorescenčních barviv nebyla dříve publikována. Některé studie uvádějí, že způsob interakce SG s DNA závisí značně na koncentraci barviva a byly popsány nejméně dva způsoby interakce, a to interkalace a povrchová vazba do malého žlábků DNA dvoušroubovice (Zipper et al., 2004). Při nízké koncentraci barviva dochází nejprve k interkalaci, při vyšší přechází vazba v povrchovou, pouze tento děj však doprovází prudký nárůst fluorescence. Bylo ověřeno, že SG se přednostně váže na delší amplikony a na amplikony s vyšším obsahem G/C bází (Giglio et al., 2003). Pro SG je navíc typická redistribuce v průběhu tání, SG se uvolňuje z vazby na produkty s nízkou teplotou tání a pak se váže se na produkty tající při vysoké teplotě. Ve vysoké koncentraci SG inhibuje PCR (Nath et al., 2000). Počet cyklů PCR může analýzu tání ovlivnit, vzhledem k postupně narůstajícímu poměru DNA/SG (Giglio et al., 2003). Pro menší variabilitu je tedy vhodné použít dostatečně saturující koncentrace SG, avšak těsně pod inhibičním limitem pro PCR.

Pro výše popsané nevýhody byla nedávno uvedena na trh technologie analýzy tání dsDNA s vysokým rozlišením HRMA (z angl. High Resolution Melting Analysis), vyvinutá speciálně pro detekci mutací (Gundry et al., 2003). HRMA přístroje sbírají nesrovnatelně více dat o fluorescenci na jeden stupeň Celsia teplotní změny než starší přístroje, což umožňuje jemnější rozlišení profilu tání. Velmi výhodná je kombinace s využitím barviva LCGreen I (Wittwer et al., 2003), které neovlivňuje natolik průběh PCR a nebyla u něj pozorována redistribuce typická pro SG. LCGreen I lze použít při 90% saturaci, kdežto SG kompletně inhibuje PCR už při 50% saturaci. Srovnání citlivosti a specifity barviv LCGreen I a SYBR Green I a různých přístrojů, které mohou být využity pro analýzu tání, vyznělo jednoznačně ve prospěch LC Green I a přístrojů s vysokým rozlišením (Herrmann et al., 2006).

### I. 7. 2. 3 McRAPD (Melting curve of RAPD)

Naší výzkumnou skupinou bylo již ukázáno, že principu analýzy tání lze s výhodou využít k rychlé a přesné charakterizaci komplexních produktů RAPD-fingerprintingu lékařsky významných kvasinek (Plachý et al., 2005). Tento přístup byl pojmenován McRAPD (z angl. Melting curve of Random Amplified Polymorphic DNA). RAPD-fingerprinting poskytuje druhově specifické spektrum produktů, které jsou tradičně analyzovány gelovou elektroforézou i přes softwarovou podporu poměrně pracně. Toto tradiční provedení je relativně zdlouhavé a do vyhodnocení vnáší jistou míru subjektivity, protože pruhy produktů ke srovnávání je potřeba vybrat manuálně a slabší pruhy je potřeba z analýzy vyřadit, protože jejich viditelnost kolísá na hranici citlivost barvení gelu. Plachý a kol. (2005) získali v pilotní studii na přístroji LightCycler pro RAPD produkty 48 kmenů pěti druhů patogenních kvasinek křivky tání s 2–5 druhově specifickými píky, umožňujícími jejich přímou identifikaci. I když intenzita píků byla u různých kmenů téhož druhu částečně variabilní, teplota tání konkrétního produktu byla vysoce reprodukovatelná.

Hlavní výhodou McRAPD oproti tradiční RAPD je to, že umožňuje vyhnout se používání elektroforézy v gelu a pracné a částečně subjektivní analýze rozložení pruhů, což by mělo identifikaci kvasinek urychlit a zpřesnit. Výstupem McRAPD jsou numerická data, interpretace výsledků McRAPD proto může být objektivnější a nabízí potenciál automatizace. Ke zpracování výsledků postačuje personál bez zvláštní mykologické odbornosti. Přenos tepla v kapilárách z křemičitého skla v menším objemu vzorku je rychlejší a reprodukovatelnější než v klasických PCR zkumavkách, což snižuje vliv termocyklieru na variabilitu výsledků. Po celou dobu analýzy je vzorek uzavřen v kapiláře a na závěr v tomto stavu i likvidován (closed-tube approach), což výrazně omezuje možnost křížové kontaminace produktem. Při použití běžné *Taq* polymerázy a jednoho primeru, který by poskytoval méně složité a stabilnější soubory produktů, by měla být McRAPD schopná pokrýt všechny lékařsky významné druhy kvasinek a mohla by se stát jednoduchým, ekonomickým a výkonným nástrojem identifikace v mykologických laboratořích.

Nevýhodou dříve publikované metodiky je nutnost pracné fenol-chloroformové izolace DNA z předkultivované čisté kultury a omezení přístroje LightCycler, který není primárně uzpůsoben pro analýzu komplexnějších křivek tání a při současné analýze více jak cca 10 vzorků podstatně redukuje objem dat a snižuje tím přesnost identifikace. Tyto problémy by mohly být překonány zjednodušenou izolací DNA z kolonií minimální velikosti (Steffan et al., 1997) a provedením analýzy na HRMA přístroji, což bylo spolu s další optimalizací vyhraněnosti reakčních podmínek a testováním možných identifikačních algoritmů na širším spektru lékařsky významných druhů kvasinek hlavním úkolem této práce.

## II. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této disertační práce bylo rozpracovat dříve navržený McRAPD přístup k identifikaci patogenních kvasinek do podoby potenciálně využitelné v rutinní identifikaci.

Dílčí cíle práce lze shrnout takto:

1. Převést dříve navržený McRAPD protokol na přístroj umožňující analýzu tání s vysokým rozlišením.
2. Ověřit a případně optimalizovat metodu přípravy templátu pro McRAPD amplifikaci technikou hrubých lyzátů s cílem zjednodušit provedení celé metody pro uplatnění v rutinní identifikaci kvasinek.
3. Optimalizovat dříve navržený McRAPD protokol pro druhovou identifikaci patogenních kvasinek s cílem snížit mezikmenovou variabilitu výsledků a zvýšit reprodukovatelnost výsledků.
4. Navrhnout různé přístupy k hodnocení McRAPD dat pro druhovou identifikaci a vyhodnotit míru správné identifikace těmito přístupy na širším spektru lékařsky významných druhů kvasinek.
5. Posoudit výkonnost McRAPD ve srovnání s dostupnými konvenčními rutinními postupy.
6. Pilotně posoudit použitelnost McRAPD k automatizované typizaci izolátů stejného druhu ve srovnání s karyotypizací izolátů pomocí PFGE.

### III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### III. 1 Materiál

##### III. 1. 1 Mikroorganismy

V práci byly použity různé kmeny lékařsky významných kvasinek převážně druhů *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa* a *Saccharomyces cerevisiae*. Většina kmenů byla izolována z různorodého klinického materiálu od pacientů, kteří byli hospitalizováni ve Fakultní, příp. Vojenské, nemocnici v Olomouci. Část kmenů byla získána od Dr. Mine Yücesoy z univerzity Dokuz Eylül (Turecko), sbírky kultur kvasinek CCY Bratislava a Doc. RNDr. Jozefa Noska, CSc. (PRIF UK, Bratislava). Kmeny *C. albicans* pro testování kmenové typizace pocházely z Japonska.

Kvasinky byly získány ze sbírky klinických izolátů kvasinkových mikroorganismů Ústavu mikrobiologie a Ústavu biologie LF UP a FN Olomouc, kde byly uchovávány v médiu obsahujícím 20 % BBL<sup>®</sup> Skim Milk Powder (BD Diagnostic Systems, USA) při -70 °C. Jejich identifikace probíhala na Ústavu mikrobiologie LF UP Olomouc tradičními fenotypizačními postupy (CHROMagar, auxanogramy, zymogramy a vybrané kmeny také komerčními identifikačními soupravami Auxacolor (Sanofi Diagnostics Pasteur, Francie), resp. API ID 32C (bioMérieux, Francie)).

Výběr kmenů pro účely práce byl proveden s ohledem na zajímavé klinické situace, ze kterých byly získány, a na předpokládanou genetickou identitu či odlišnost izolátů. Seznam kmenů je uveden v příloze A.

##### III. 1. 2 Chemikálie

10× *Taq* pufr bez MgCl<sub>2</sub> (Top-Bio, ČR)  
Agaróza (Life Technologies, UK)  
BSA (Promega, USA)  
Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, USA)  
Deionizovaná H<sub>2</sub>O (MilliQ Water, Millipore USA)  
Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, USA)  
DNA marker 200–1500 (Top-Bio, ČR)  
DNA marker 155–970 (Top-Bio, ČR)  
dNTPs (Promega, USA)  
EDTA (Amresco, USA)

Etanol (Amresco, USA)  
Ethidium bromid (Carl Roth, Německo)  
Glukóza (Lachema, ČR)  
Glycerol (Sigma-Aldrich, USA)  
Chloramfenikol (Sigma-Aldrich, USA)  
Chlorid hořečnatý (Lachema, ČR)  
Chloroform (Sigma-Aldrich, USA)  
Kyselina boritá (Lachema, ČR)  
Kvasničný extrakt (Himedia, Indie)  
LCGreen I Plus (Idaho Technology, USA)  
Mykologický pepton (Himedia, Indie)  
PCR olej (Top-Bio, ČR)  
PCR voda (Top-Bio, ČR)  
Primery (Generi Biotech, ČR)  
Sabouraud agar s chloramfenikolem – Petriho misky (BD Diagnostic Systems, USA)  
Sacharóza (Sigma-Aldrich, USA)  
Skim Milk Powder (BD Diagnostic Systems, USA)  
Sorbitol (Sigma-Aldrich, USA)  
*Taq* DNA polymeráza Unis (Top-Bio, ČR)  
Thiamin (Sigma-Aldrich, USA)  
Tris 1 M roztok (Ambion, USA)  
Trizma base (Sigma-Aldrich, USA)  
YeaStar Genomic DNA Kit (Zymo Research, USA)  
Zymolyáza (Sigma-Aldrich, USA)

### III. 1. 3 Pomůcky a přístroje

Názvy a původ použitých přístrojů jsou uvedeny přímo v textu.

## III. 2 Metody

### III. 2. 1 Uchovávání klinických izolátů

Příprava zamrazovacího média: 15 g Skim Milk Powder se dobře rozmíchalo ve 150 ml 50 °C teplé destilované vody a autoklávovalo 15 minut při 121 °C. Po vychladnutí se přidalo 75 ml sterilního 86% glycerolu a po promíchání se médium rozplnilo do kryozkumavek.

Sterilní mikrobiologickou kličkou se do kryozkumavky s médiem přenesla část kolonie kvasinek a dobře promíchala, kmeny bylo nutné pro zachování genetické stability uchovávat v mrazicím boxu při -70 °C.

### III. 2. 2 Kultivace kvasinek

Analyzované mikroorganismy byly z kryozkumavek rozočkovány na pevnou půdu (Sabouraud s chloramfenikolem) v Petriho miskách a kultivovány při 30 °C po dobu 72 hodin. Po přeočkování na novou Petriho misku bylo možné po objevení viditelných kolonií (nejdéle do 24 hodin) přistoupit k extrakci DNA dle Steffan a kol. (1997).

Pro izolaci DNA komerční soupravou byl vzorek narostlých mikroorganismů přenesen do 20 ml tekutého živného média YPG (1% kvasničný extrakt, 1% mykologický pepton a 1% glukóza) s 50 µl/ml chloramfenikolu a 100 µl/ml thiaminu. Zásobní roztok antibiotika chloramfenikolu v etanolu (34 mg/ml) byl uchováván při -20 °C. Kultury byly inkubovány přes noc v třepačce (Julabo SW 22, Seelbach, SRN) při 30 °C a 120 otáčkách za minutu. Ráno byl 1 ml této přesnoční kultury přenesen do 20 ml YPG a následně byl průběžně sledován vývoj absorbance roztoku při vlnové délce 660 nm (Spekol 221, Carl Weiss Jena, SRN). Při absorbanci v rozmezí 0,9–1,0 (pozdní exponenciální fáze růstu kultury) byla kultivace ukončena a bylo započato s extrakcí DNA.

### III. 2. 3 Příprava templátové DNA

#### III. 2. 3. 1 „Párátková“ (Toothpick) PCR

Pro rychlou a levnou analýzu mnoha klinických izolátů současně byla optimalizována metoda pro amplifikaci DNA přímo z lyzátů samostatných kolonií (Steffan et al., 1997).

- 1) Analyzované mikroorganismy byly naočkovány na Sabouraudovu půdu s chloramfenikolem v Petriho miskách a kultivovány při 30 °C po dobu nejvýše 24 hodin.
- 2) Pro každou reakci byla odebrána část mikrokolonie špičkou mikropipety a resuspendována v 5 µl čerstvě připraveného lyzačního roztoku (1 M sorbitol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dithiothreitol a 12 U Zymolyázy). Zymolyáza byla připravena jako zásobní roztok o koncentraci 12 U/µl a byla zamražena v alikvotech při -20 °C.
- 3) Suspenze byla inkubována nejméně 20 minut při 37 °C v termobloku (TB1, Schoeller Pharma Praha, ČR) a následně zředěna na 300 µl přidáním TE pufru (10 mM Tris pH 8 a 1 mM EDTA). Po centrifugaci byl supernatant přidáván do amplifikační reakce. Takto připravený lyzát lze skladovat zamražený pro pozdější zpracování při -20 °C.



### III. 2. 3. 2 Extrakce DNA pomocí YeaStar Genomic DNA komerční soupravy

YeaStar Genomic DNA kit je určen pro rychlou extrakci DNA z různých druhů kvasinek a plísní. Výrobce doporučuje následující pracovní postup:

- 1) Stočit 0,4–1,5 ml tekuté kultury kvasinek (podle hustoty, cca  $1-5 \times 10^7$  buněk/ml, to odpovídá cca 1 ml kultury s OD=1) při 6 000 otáčkách 5 minut. Odstranit supernatant.
- 2) Přidat 120  $\mu$ l YD Digestion Buffer a 5  $\mu$ l R-Zymolyase. Pelet se resuspenduje vortexováním a směs se inkubuje při 37 °C po dobu 60 minut.
- 3) Přidat 120  $\mu$ l YD Lysis Buffer a promíchat vortexováním.
- 4) Přidat 250  $\mu$ l chloroformu, směs 1 minutu promíchat.
- 5) Směs centrifugovat 2 minuty při 10 000 otáčkách a supernatant přenést do Zymo-Spin III kolonky nasazené do čisté mikrozkušavky o objemu 1,5 ml.
- 6) Mikrozkušavku s kolonkou centrifugovat 1 minutu při 10 000 otáčkách, dvakrát promýt pomocí DNA Wash Buffer.
- 7) Kolonku přenést do nové mikrozkušavky a nanést 60  $\mu$ l vody. Po jednodominutové inkubaci stočit při 10 000 otáčkách 1 minutu a eluát uchovat.

### III. 2. 4 Příprava PCR směsi

Metoda RAPD je citlivá na kontaminaci, proto byla směs sestavována vždy v aseptickém prostředí laminárního boxu (EM Box 180, Ekom, ČR). Automatické pipety (Finnpipette, Thermo Scientific, USA) byly vyhrazeny pouze pro tento účel a používaly se jednorázové špičky (Axygen Scientific, USA) opatřené filtrem zachycujícím aerosol vznikající při nasávání tekutiny do špičky. Věrohodnost dosažených výsledků byla zajištěna provedením negativní kontroly. Aby byly následky pipetovacích chyb plynoucí z pipetování velmi malých objemů minimální, byl připraven vždy tzv. master mix (Mx), který kromě templátové DNA obsahoval všechny složky reakční směsi. Aby se zabránilo předčasné nespecifické amplifikaci, směs byla sestavována v chladícím stojánku.

#### III. 2. 4. 1 Primer

Pro druhovou identifikaci vybraných klinicky významných druhů kandid byl zvolen primer se sekvencí 5'-ACGGGCCAGT-3', který byl navržen a otestován jako vhodný pro tento účel jinými autory (Liu et al., 1996; Plachý et al., 2005). Zásobní roztok tohoto primeru byl připraven rozpuštěním lyofilizovaného primeru v 10 mM Tris na koncentraci 80  $\mu$ M.

### III. 2. 4. 2 PCR-fingerprinting pomocí RAPD na přístroji RapidCycler 2

V tabulce 1 je uveden výsledný protokol pro přípravu reakční směsi McRAPD.

**Tabulka 1 – Složení master mixu pro jednu McRAPD reakci**

Komponenty Mx	Přidávaný objem ( $\mu$ l)	Výsledná koncentrace
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,8	2 mM
10× Taq pufr (bez MgCl <sub>2</sub> ) (10×)	1	1×
Primer (80 $\mu$ M)	0,05	0,4 $\mu$ M
dNTPs (25 mM každý)	0,08	0,2 mM každý
BSA (2,5 mg/ml)	1	250 $\mu$ g/ml
LCGreen I Plus (10×)	1	1×
Taq DNA polymeráza Unis (5 U/ $\mu$ l)	0,5	2,5 U
PCR voda	4,57	
Celkový objem Mx pro jednu reakci	9 $\mu$ l	

Objem jednotlivých reagensů byl násoben vždy počtem vzorků, které měly být zpracovány (včetně negativní kontroly). Pro provedení RAPD bylo potřeba napipetovat do skleněné kapiláry (Roche Diagnostics, Německo) 9  $\mu$ l směsi Mx a přidat připravený extrakt DNA (viz kap. III. 2. 3) o objemu 1  $\mu$ l. Kapiláry v adaptéru byly krátce stočeny na stolní centrifuze (700× g) a vloženy do přístroje RapidCycler 2 (Idaho Technology, USA), kde probíhala amplifikace dle následujících parametrů:

Reakční podmínky: počáteční denaturace 95 °C 5 minut  
amplifikace DNA – 45 cyklů denaturace 95 °C 5 s  
annealing 48 °C 10 s  
extenze 72 °C 40 s  
závěrečná extenze 72 °C 5 minut

Ramping byl nastaven na 1 °C/s, reakce probíhala cca 75 minut.

### III. 2. 5 Elektroforetické dělení produktů amplifikace

#### III. 2. 5. 1 Příprava gelu

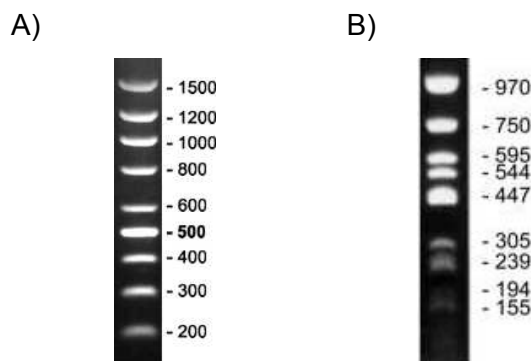
Pro dělení PCR produktů byl použit 2% (w/v) agarózový gel, který obsahoval ethidium bromid (1  $\mu$ g/ml) a 1× TBE pufr. Směs práškové agarózy a 1× TBE pufru byla povařena v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy. Po ochlazení směsi na 50 °C bylo přidáno a rozmícháno příslušné množství ethidium bromidu a gel byl nalit do elektroforetické vany Easy Cast s hřebínky (Horizontal electrophoresis system – modely #B1, #B1A a #B2; Owl, USA). Gel bylo potřeba nechat dostatečně ztuhnout, nejméně jednu hodinu, a poté převrstvit 1× TBE puforem.

Složení 10× TBE pufru: 108 g Tris, 55 g kyseliny borité, 40 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8), doplnit do 1 litru destilovanou vodou.

### III. 2. 5. 2 Nanášení produktů PCR na gel

Po odzátkování se kapiláry obrátily ústím do 1,5 ml mikrozkušavky a krátce stočily na minicentrifuze, aby se vzorek dostal z kapiláry na dno zkumavky. 10 μl vzorku obsahujícího produkt amplifikace bylo smícháno s 2 μl nanášecího pufru (0,25% bromfenolová modř a 40% sacharóza v destilované H<sub>2</sub>O). Tato směs byla nanášena do příslušné jamky v gelu.

Pro srovnání bylo současně do krajních jamek na gel nanášeno 5 μl markeru molekulových hmotností, který byl smíchán se 2 μl nanášecího pufru a 5 μl 1× TBE pufru. Vzhledem k předpokládané velikosti produktů byly zvoleny DNA markery s rozsahem fragmentů 200–1500 bp a 155–970 bp, velikost jednotlivých fragmentů DNA je uvedena na obrázku 6.



Obr. 6 - Velikosti fragmentů DNA v bp u markerů molekulových hmotností (Top-Bio, ČR)  
A) 200–1500, B) 155–970

Dělení probíhalo při napětí 5 V na centimetr vzdálenosti elektrod po dobu cca 1 až 3 hodiny dle velikosti gelu. Zdroj napětí: Apelex electrophoresis power supply ST 606T, (Apelex, Francie).

### III. 2. 5. 3 Analýza fingerprintů

Vizualizace DNA fragmentů proběhla pomocí UV transiluminátoru (Electronic MultiWave Transilluminator, Ultra-Lum, USA) a snímání pomocí digitální kamery propojené s počítačem. Obrazy gelů byly dokumentovány softwarem ScionImage (Scion, USA) a ukládány ve formátu TIFF.

Snímky gelů byly zpracovány pomocí programu GelCompar II (Applied Maths, Belgie). Zpracování obrazu zahrnovalo následující kroky: a) identifikaci drah, b) výběr reprezentativního průřezu drahami pro konstrukci denzitometrické křivky, c) označení pruhů markeru pro normalizaci – kompenzace rozdílu v pohyblivosti molekul na okrajích a ve středu gelu, d) označení pruhů podle píků denzitometrických křivek. Výsledné fingerprinty (rozložení pruhů v jednotlivých dráhách) byly poté propojeny se zadanými identifikačními údaji o vzorcích v databázi. Stabilita fingerprintů byla kontrolována ve dvou po sobě jdoucích nezávislých experimentech, v případě neshody se pokus opakoval. Normalizované údaje o poloze pruhů v drahách vybrané konkrétní sady fingerprintů byly srovnávány pomocí Jaccardova koeficientu podobnosti, který je založen na srovnávání poloh pruhů (s uvážením 1,5% tolerance v poloze pruhu). Na základě těchto informací byla sestavena matice koeficientů podobnosti, která byla následně zpracována metodou UPGMA. Výsledkem analýzy podobnosti fingerprintů byl dendrogram.

### III. 2. 6 Analýza křivky tání

Analýza křivky tání byla prováděna na přístroji High Resolution Melter HR-1 (Idaho Technology, USA). Kapilára s produktem amplifikace se vždy umístila do ingotu a spustil se program na analýzu tání. Rychlost teplotního přechodu byla nastavena na 0,3 °C/s, touto rychlostí lze za hodinu změřit přibližně 40 vzorků. Sběr fluorescenčních dat probíhal od 75 do 95 °C, zhruba uprostřed tohoto rozmezí docházelo k největšímu poklesu fluorescence. Mezi měřeními jednotlivých vzorků se ingot ochlazoval na teplotu 65 °C. Standardní výkon LED byl nastaven na 30 %. Teplota vzorku a fluorescenční signály se převáděly do 16bitových digitálních signálů, přístroj sbíral přibližně 60 dat na 1 °C a ukládal je ve formátu .vs2. Data se průběžně zobrazovala na monitoru připojeného počítače jako graf závislosti intenzity fluorescence na teplotě a analyzovala se pomocí HR-1 analysis software (Idaho Technology, USA). Pro usnadnění interpretace byla data upravena normalizací, kdy se nejprve kurzory vymezila oblast tání vzorku a poté program automaticky převedla fluorescenční signály do škály 0 až 100 %. Pro normalizaci křivek tání souboru izolátů, který byl použit pro testování identifikačních algoritmů k vyhodnocení McRAPD dat, byly použity normalizační meze 75,5 až 77,5 °C a 91,5 až 93,5 °C. Současně byl také sestaven grafický výnos záporně vzaté první derivace intenzity fluorescence podle teploty ( $-dF1/dT$ ). Teplota tání produktu amplifikace by měla odpovídat teplotě, při které křivka tání vykazuje jasný pík. Derivované křivky byly kvůli usnadnění odečítání píků vyhlazeny jen do té míry, aby nedocházelo ke ztrátě informativních dat.

### III. 2. 7 Zpracování rozdílů v průběhu křivek tání

Data o průběhu křivek tání se exportovala z programu HR-1 analysis software jako textový soubor a vložila se do tabulkového procesoru. Zde byly jednoduše spočteny vzájemné rozdíly hodnot intenzity fluorescence v každém měřeném bodě v průběhu křivek tání pro každý pár vzorků určitého souboru izolátů. Součet absolutních rozdílů hodnot představoval rozdílnost mezi křivkami tání konkrétní dvojice izolátů:

$$AD_{1,2} = \sum_{t=77,5}^{91,5} |f_1(t) - f_2(t)|$$

kde  $AD_{1,2}$  je absolutní rozdíl mezi izoláty č. 1 a 2 v intervalu teplot od 77,5 °C do 91,5 °C

$f_1(t)$  je normalizovaná fluorescence izolátu č. 1 měřená při teplotě  $t$

$f_2(t)$  je normalizovaná fluorescence izolátu č. 2 měřená při teplotě  $t$

Nejvyšší hodnotě absolutních rozdílů ( $AD_{\max}$ ) v určitém souboru izolátů byla přiřazena relativní vzdálenost 1, relativní vzdálenosti dalších dvojic se vztáhly k nejvyšší hodnotě absolutního rozdílu:

$$RD_{1,2} = \frac{AD_{1,2}}{AD_{\max}}$$

Následně se sestavila matice relativních vzdáleností pro všechny dvojice srovnávaných izolátů (příklad viz příloha B). Volně přístupná aplikace Phylip verze 3.6 (soubor neighbor.exe) (Felsenstein, 1989) umožnila načtení matic ve formátu textových souborů (\*.txt) a vyhodnocovala tyto matice metodou UPGMA. Na základě výsledku tohoto matematického zpracování byl pak v programu PhyloDraw 0.8 (Choi et al., 2000) nebo TreeView 1.6.6 (Page, 1996) zkonstruován strom podobnosti, který lze exportovat do počítačových grafických formátů (např. BMP).

Pro účely zpracování velkého objemu numerických dat, jejich srovnání u různých izolátů a pro automatizaci vyhodnocování dat byl navržen volně šiřitelný program QAS. Byl vytvořen v jazyce Java, což umožňuje fungování na různých platformách a průběžnou aktualizaci. Software QAS umožní stažení normalizovaných dat, validaci vstupních dat, normalizaci tepelných bodů, jejich generování ve formátu .csv a tvorbu matice představující kvantitativní rozdíly mezi páry křivek tání. Program vytvoří infile vhodný pro UPGMA nebo neighbor-joining analýzu programem Phylip, výsledná data lze využít k tvorbě dendrogramu.

## IV. VÝSLEDKY

### IV. 1 Převedení protokolu McRAPD na přístroj RapidCycler

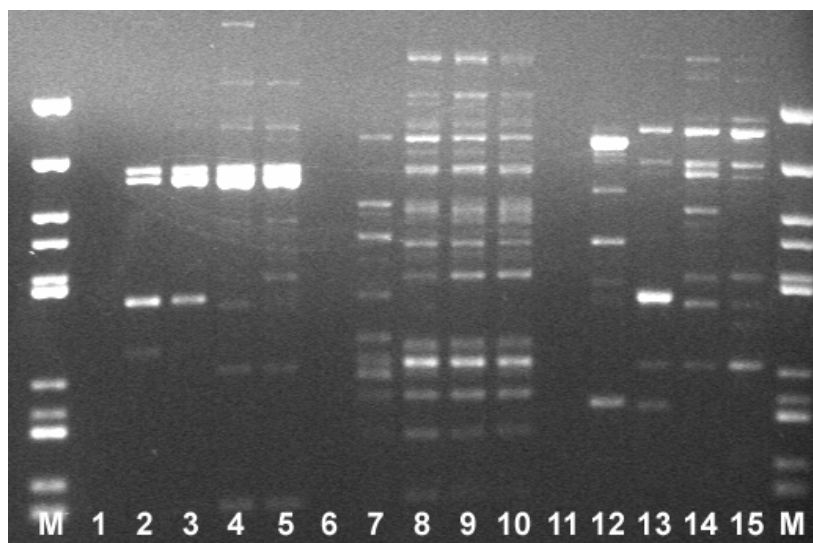
Jedním z úkolů práce bylo uzpůsobit původní protokol McRAPD analýzy (Plachý et al., 2005) pro termocykler RapidCycler 2 (Idaho Technology, USA) a přístroj pro analýzu teplot tání High Resolution Melter HR-1 (Idaho Technology, USA). Oba tyto přístroje využívají principy použité v přístroji LightCycler (Roche Diagnostics, Německo), který ovšem není uzpůsoben k analýze komplexních křivek tání s více píky a většího počtu vzorků. Pokud nemá dojít během exportu komplexních dat z analýzy teploty tání produktů RAPD pro další počítačové zpracování k jejich redukci, může být v LightCycleru souběžně prováděna amplifikace jen 8–10 vzorků. Toto omezení neplatí při použití kombinace přístrojů RapidCycler 2 a HR-1, ve kterých lze souběžně pohodlně zpracovat až 48 vzorků. Protože tyto dva přístroje nedisponují možností měření fluorescence v průběhu PCR (tzv. PCR v reálném čase), což není pro McRAPD potřebné, jsou navíc podstatně levnější než LightCycler. High Resolution Melter HR-1 na rozdíl od modelu LightCycler, na kterém byla prováděna pilotní studie McRAPD identifikace kvasinek, deklaruje vyšší rozlišení analýzy tání.

Výsledkem McRAPD analýzy je normalizovaná křivka tání nebo její derivovaná forma s charakteristickými píky odpovídajícími teplotě tání produktů RAPD amplifikace. Pro účely druhové identifikace postačuje nižší rozlišovací schopnost metody než u typizace. Základním předpokladem bylo, že zvýšení vyhraněnosti (stringence) reakčních podmínek povede k amplifikaci omezeného množství RAPD produktů a tím ke snížení mezikmenové variability výsledků, která není při druhové identifikaci potřebná a může naopak druhovou identifikaci ztěžovat. Při použití vyhraněnějších podmínek lze navíc očekávat vyšší reprodukovatelnost výsledků, která je obecně slabou stránkou RAPD techniky. Při optimalizaci bylo navázáno na výsledky získané při pilotních pokusech na přístroji LightCycler. Optimalizace byla pro usnadnění testování vlivu teploty nasedání primerů částečně prováděna na gradientovém termocykleru RoboCycler. Výsledné složení reakční směsi a reakční podmínky McRAPD jsou shrnuty v kapitole III. 2. 4. 2.

#### IV. 1. 1. Sestavení reakční směsi

V publikaci Plachý a kol. (2005) byla reakční směs pro McRAPD sestavována pomocí komerční soupravy LightCycler DNA Master SYBR Green I Mix (Roche Diagnostics, Německo). Pro vytvoření flexibilnějšího a ekonomičtějšího systému byla navržena *in-house* reakční směs. Původní reakční objem 20  $\mu$ l byl snížen z ekonomických

důvodů na poloviční objem, což je dle doporučení výrobce přístroje ke zdárnému průběhu reakce postačující. Barvivo SYBR Green I bylo nahrazeno barvivem LCGreen I Plus, které vykazuje lepší vlastnosti pro HRMA, především s ohledem na redistribuci barviva a menší inhibiční vliv na průběh PCR (viz kap I. 7. 2. 2). Do reakční směsi se přidával roztok BSA, který zamezuje denaturaci *Taq* polymerázy na velkém vnitřním povrchu kapilár, a to ve výsledné koncentraci 250 µg/ml. Hořčík přidávaný do reakční směsi má za úkol stabilizovat interakci primer-templátová DNA. Příliš nízká koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů vede k neefektivní amplifikaci v důsledku snížené aktivity *Taq* polymerázy. Jejich vyšší koncentrace sice zvyšuje výtěžek, ale za cenu nižší vyhraněnosti (stringence), což pěkně ilustruje obrázek 7. U běžných termocyklerů postačuje 1,5 mM koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů v reakční směsi, která bývá dosažena použitím běžně dodávaného pufru, u amplifikace v kapilárách se doporučuje 2 až 4 mM koncentrace. V původním McRAPD protokolu byla použita 4 mM koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů, snahou bylo tuto koncentraci snížit. Ve srovnání s původní koncentrací byly tedy testovány koncentrace 3 mM, 2 mM, 1,5 mM a 0,8 mM, pro další pokusy byla zvolena koncentrace 2 mM (Tab. 2) s přiměřenou výtěžností reakce a zároveň menším množstvím amplifikačních produktů (Obr. 7).



Obr. 7 – Optimalizace koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů v reakční směsi

M - DNA marker 155–970 bp, Dráhy 1, 6, 11: 0,8 mM; dráhy 2, 7, 12: 1,5 mM; dráhy 3, 8, 13: 2,0 mM; dráhy 4, 9, 14: 3,0 mM; dráhy 5, 10, 15: 4,0 mM. Dráhy 1 až 5: *C. albicans* ATCC 76615; dráhy 6 až 10: *C. glabrata* ATCC 90080; dráhy 11 až 15: *C. krusei* ATCC 90878.

Další možností optimalizace PCR je upravení koncentrace primerů. Je-li jejich koncentrace příliš nízká, mohou se vyčerpat před dokončením reakce. Primery se běžně přidávají v nadbytku, v důsledku čehož může docházet k jejich kompetici a tvorbě

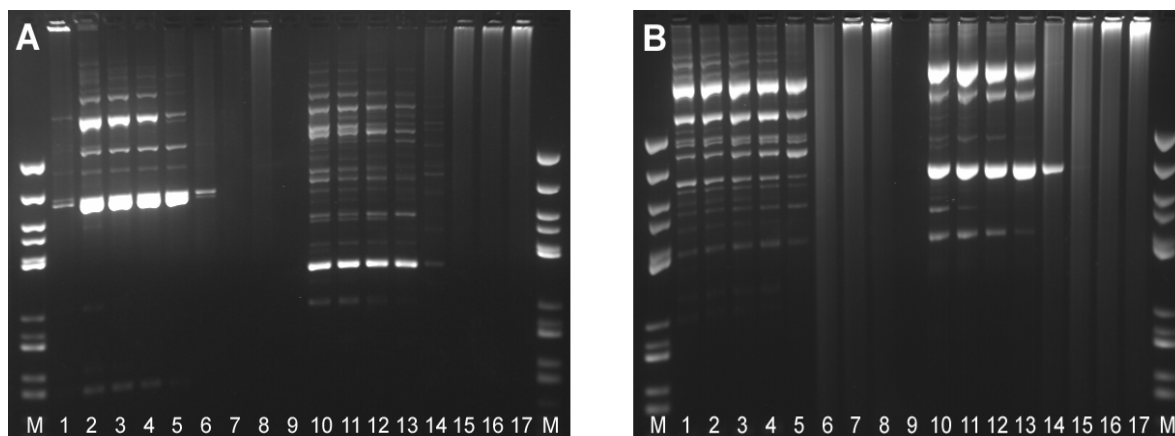
nespecifických produktů. Oproti původní koncentraci 0,6  $\mu\text{M}$  byla proto koncentrace primerů snížena na postačující 0,4  $\mu\text{M}$  (Tab. 2).

#### IV. 1. 2 Uspořádání reakčních podmínek

Snahou bylo reakci uspořádat tak, aby byla analýza funkční a zároveň proveditelná v co nejkratším čase. Přístroj RapidCycler tyto požadavky splňuje, díky skleněným kapilárám a rychlým tepelným přechodům 5–10  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  dosahuje přesnějších amplifikačních profilů a kratšího času potřebného pro reakci než klasické blokové termocyklery. Pro denaturaci výrobce uvádí při reakčním objemu 10  $\mu\text{l}$  postačující dobu 0 s, pro důkladnější denaturaci komplexnějšího templátu byla tato doba prodloužena na 5 s. Pro nasedání primeru výrobce uvádí při reakčním objemu 10  $\mu\text{l}$  postačující čas annealingu 0 s pro dosažení maximální specifity, vzhledem k nižší teplotě nasedání primeru byla doba prodloužena na 10 s. Pro dobu prodlužování produktů teoreticky také postačuje 0 s pro krátké produkty, pro delší je třeba počítat s rychlostí extenze 25 nukleotidů/s při 72  $^{\circ}\text{C}$ . Zvolená doba 40 s postačuje tedy pro bezproblémovou amplifikaci produktů o velikosti 1000 bp.

Nastavení teploty nasedání primerů patří ke kritickým parametrům amplifikačních reakcí, typicky se při RAPD pro typizační účely používá nízká teplota nasedání primerů. Snížení teploty nasedání vede ke snížení specifity reakce, protože primery mohou nasedat i na úseky templátové DNA, které nejsou dokonale komplementární. Zároveň přílišné snížení teploty může vést k vymizení produktu, protože nasedání primerů na příliš mnoha místech genomu může bránit efektivní amplifikaci. Se zvyšováním teploty nasedání zase klesá pravděpodobnost nasednutí primeru a dochází ke zjednodušení RAPD spektra. Snahou bylo zvýšit teplotu nasedání oproti původně použité teplotě 40  $^{\circ}\text{C}$ , aby byly získány méně komplexní fingerprinty a zvýšena specifita reakce. Pro optimalizaci teploty nasedání primerů byla využita schopnost termocyklieru RoboCycler Gradient 96 (Stratagene, USA) vytvořit teplotní gradient v jamkách bloku, ve kterém docházelo k nasedání primeru. Při pokusu byly testovány teploty v rozsahu 42 až 56  $^{\circ}\text{C}$  s rozestupem 2  $^{\circ}\text{C}$ , při teplotě nad 50  $^{\circ}\text{C}$  už u některých vzorků neprobíhala dostatečně amplifikace, proto jako vyhovující byla zvolena teplota 48  $^{\circ}\text{C}$  (Tab. 2).





Obr. 8 – Optimalizace teploty nasedání primerů

M - DNA marker 155-970 bp; Dráhy 1 a 10: 42 °C; dráhy 2 a 11: 44 °C; dráhy 3 a 12: 46 °C; dráhy 4 a 13: 48 °C; dráhy 5 a 14: 50 °C; dráhy 6 a 15: 52 °C; dráhy 7 a 16: 54 °C; dráhy 8 a 17: 56 °C; dráha 9: negativní kontrola. V části A - dráhy 1 až 8: *C. albicans* I1-CAAL2-05; dráhy 10 až 17: *C. tropicalis* I3-CATR9-02; v části B - dráhy 1 až 8: *C. glabrata* I1-CAGL-31; dráhy 10 až 17: *C. krusei* I3-CAKR2-23.

Tabulka 2 – Přehled optimalizovaných parametrů McRAPD protokolu

Testovaný parametr	Výchozí stav	Stav empiricky vyhodnocený jako optimální
Reakční objem	20 µl	10 µl
Koncentrace Mg <sup>2+</sup> iontů	4 mM	2 mM
Koncentrace primerů	0,6 µM	0,4 µM
Barvivo	SYBR Green I	LCGreen I Plus
Teplota nasedání primerů	40 °C	48 °C

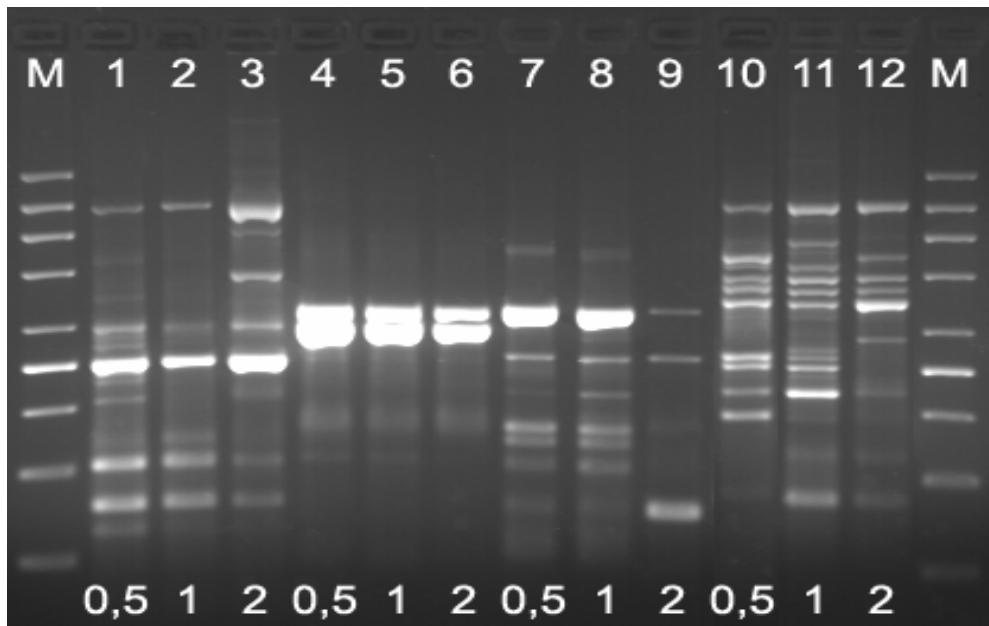
## IV. 2 Získávání templátové DNA

Metoda identifikace lékařsky významných kvasinek metodou McRAPD publikovaná Plachým a kol. (2005) zahrnovala složitou izolaci DNA fenol-chloroformovou extrakcí kombinovanou s degradací kvasinkových buněk vortexováním se skleněnými kuličkami (Hoffman, 1994) a závěrečným přečištěním extraktu pomocí DNA Lego Kitu (Top-Bio, ČR). Tento postup poskytuje velké množství čisté DNA vhodné např. pro standardizované opakované experimenty, pro účely rychlé rutinní identifikace je však příliš pracný a zdouhavý a nehodí se pro analýzu velkého množství klinických izolátů. Proto bylo v dalším kroku vyzkoušeno, zda je možné pro účely McRAPD analýzy do reakce přidávat jednoduše získaný lyzát jednotlivých kolonií. Dříve publikovaná technika zjednodušené extrakce DNA z kvasinkových buněk (tzv. párátková metoda, z angl. toothpick PCR) umožňuje rychlé a ekonomické získání DNA v množství a kvalitě dostatečné pro PCR-fingerprinting z kolonií minimální velikosti, viditelných již 12 hodin po naočkování na tuhou půdu (Steffan et al., 1997). Podstata metody spočívá v přenesení malé části kolonie kvasinek do puftru, ve kterém dojde k degradaci buněčných stěn pomocí zymolýzy, a následném mnohonásobném naředění lyzátu, aby byl potlačen případný vliv inhibitorů PCR. V této práci byly lyzáty vždy připravovány nejpozději do 24 hodin po inokulaci kvasinek na pevné médium. Vhodnou templátovou DNA bylo tímto způsobem možné získat ze všech testovaných druhů kvasinek. Modifikace tohoto izolačního postupu byla dokonce úspěšně použita pro získávání templátové DNA z plísní (Raclavský et al., 2006).

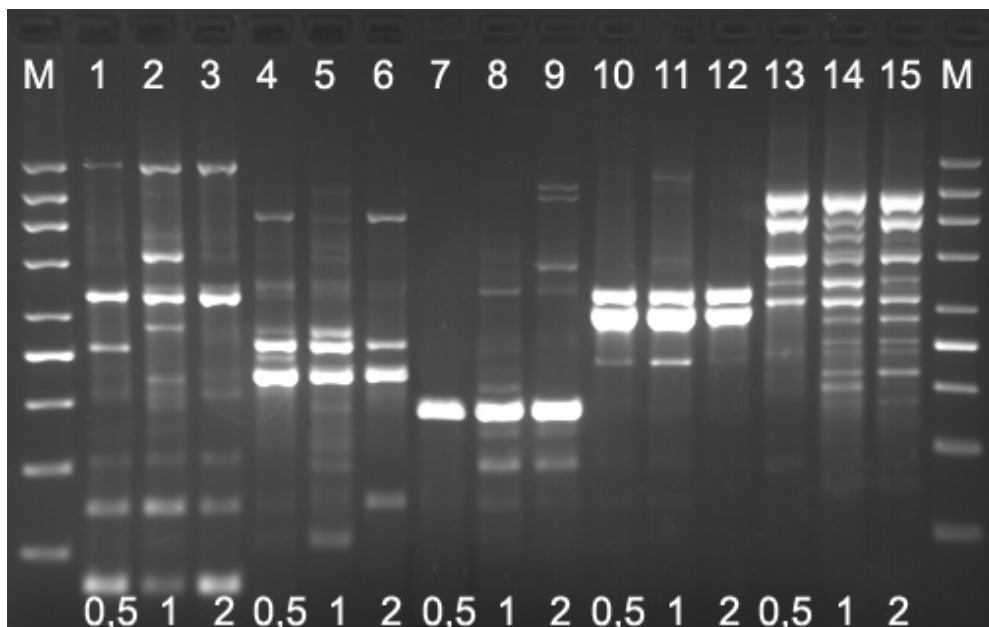
Mezi časté limitace metod založených na PCR je selhání amplifikace v důsledku působení inhibitorů, které často jsou přítomny v klinickém vzorku. Použití subkultivace namísto přímé izolace DNA z krve obchází tento problém a současně umožňuje i diagnostiku v případě směsných infekcí.

Oproti dříve publikovanému postupu (Steffan et al., 1997) bylo optimalizováno pouze množství lyzátu vnášeného do reakce na 1  $\mu$ l do 10  $\mu$ l reakce, neboť uváděné množství 0,3  $\mu$ l lyzátu do 25  $\mu$ l reakce nebylo v některých případech postačující pro uspokojivý průběh reakce a navíc reprodukovatelného pipetování tak malého objemu nelze vždy v rutinním provozu dosáhnout. Do reakce byl zkušebně vnášen různý objem roztoku templátové DNA – 0,5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l a 2  $\mu$ l. U většiny druhů neměla změna objemu lyzátu podstatnější vliv na fingerprint, u některých (např. *S. cerevisiae*) se změna projevila výrazněji. Nejstabilnějších výsledků a nejvyšší počáteční intenzity fluorescence křivek tání bylo dosaženo při vnášení 1  $\mu$ l templátové DNA do reakce, tento objem byl tedy zvolen jako optimální pro další použití. Vnášení menšího objemu DNA nemusí vést k dostatečné amplifikaci, zatímco použití velkého objemu může vést k nežádoucímu zvýšení

koncentrace inhibitorů PCR v reakční směsi. Na obrázcích 9 a 10 je demonstrován vliv objemu vnášené templátové DNA na výsledné rozložení produktů reakce.



Obr. 9 – Vliv objemu vnášené templátové DNA (0,5  $\mu$ l; 1  $\mu$ l ; 2  $\mu$ l) na výsledné rozložení produktů reakce: M - DNA marker 200–1500 bp, dráhy 1 až 3: *C. pelliculosa* I3-CAPE3-10; dráhy 4 až 6: *C. guilliermondii* I1-CAGU2-20; dráhy 7 až 9: *S. cerevisiae* I3-SACE3-37; dráhy 10 až 12: *C. glabrata* I1-CAGL-32.



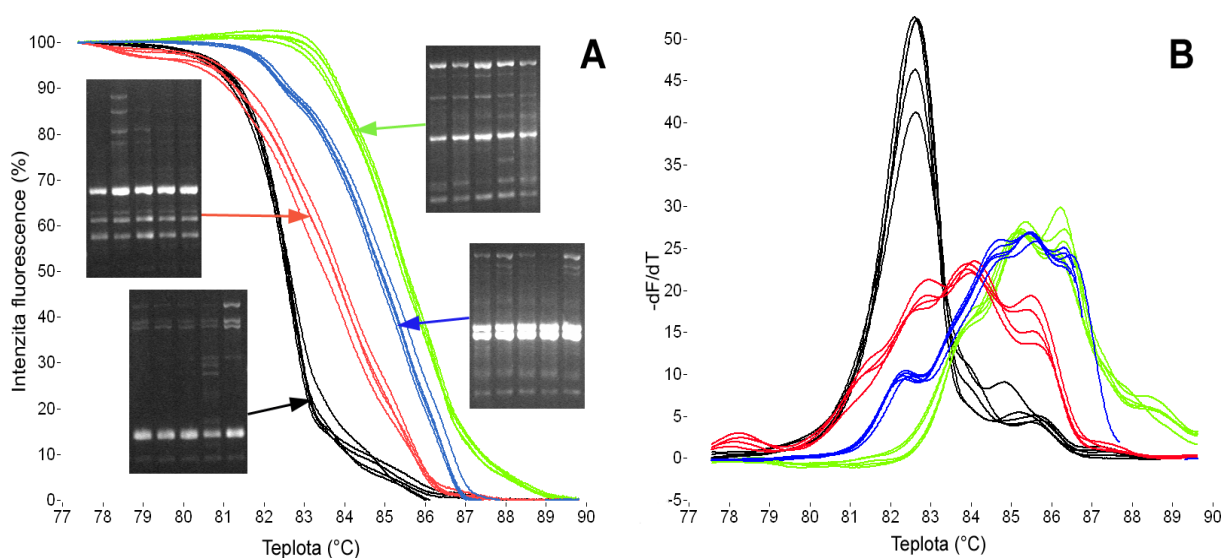
Obr. 10 – Vliv objemu vnášené templátové DNA (0,5  $\mu$ l; 1  $\mu$ l ; 2  $\mu$ l) na výsledné rozložení produktů reakce: M - DNA marker 200–1500 bp, dráhy 1 až 3: *C. albicans* ATCC 76615; dráhy 4 až 6: *C. krusei* I1-CAKR-24; dráhy 7 až 9: *C. tropicalis* I3-CATR9-37; dráhy 10 až 12: *C. lusitaniae* I1-CALU-33; dráhy 13 až 15: *C. parapsilosis* CBS 604.

### IV. 3 Zdroje variability výsledků McRAPD

Jelikož získávání templátové DNA a sestavování reakční směsi nebylo prováděno pomocí komerční soupravy, mohlo docházet při opakování analýzy k odchylkám výsledků mezi jednotlivými běhy. Na výsledek mohla mít rovněž vliv vnitrodruhová variabilita. Malé rozdíly v intenzitě pruhů, které se objevovaly u kmenů téhož druhu nebo u téhož izolátu mezi jednotlivými běhy, je navíc možné u RAPD připisovat drobným nepostihnutelným změnám v reakčních podmínkách. Proto bylo před vlastním zhodnocením potenciálu McRAPD pro identifikaci širokého spektra kvasinek provedeno posouzení opakovatelnosti techniky.

#### IV. 3. 1 Opakovatelnost přípravy hrubých lyzátů pro účely McRAPD identifikace

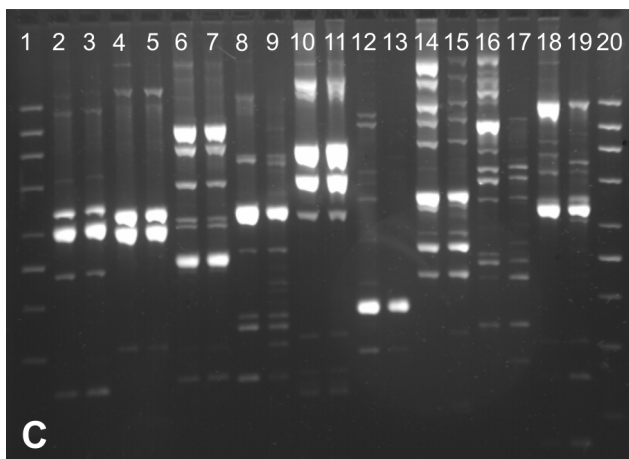
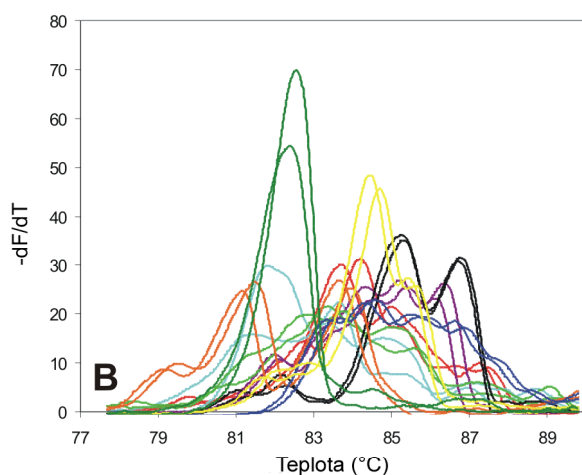
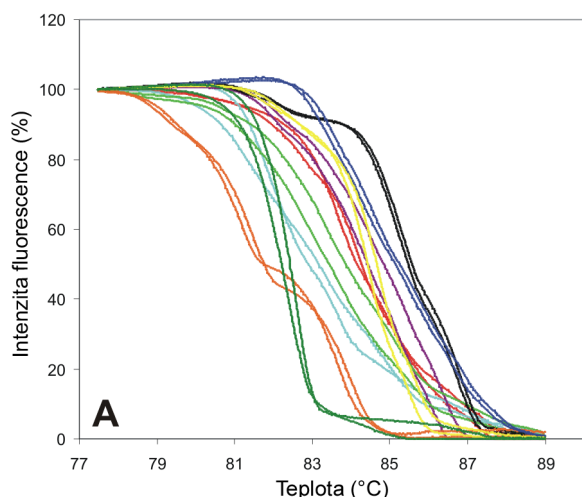
Kvalitu templátové DNA získané dle kapitoly III. 2. 3. 1 by mohlo ovlivňovat především stáří výchozích kolonií a kultivační podmínky, způsob provedení odběru kolonie a také odchylky ve složení lyzačního roztoku, jelikož se musí připravovat vždy čerstvý a není možné jej skladovat jako větší množství zásobního roztoku. Proto byla McRAPD analýza provedena současně z lyzátů několika nezávislých různě starých kolonií téhož kmene připravených vždy s novým lyzačním roztokem. Vliv opakované subkultivace a přípravy lyzátu kolonií na výsledek analýzy je však minimální, což je zřejmé z fingerprintů a z průběhu normalizovaných a derivovaných křivek tání uvedených na obrázku 11.



Obr. 11 – Normalizované (A) a derivované křivky tání (B) a odpovídající fingerprinty pěti různých hrubých lyzátů získaných z nestejně dlouho kultivovaných kolonií téhož izolátu reprezentujícího jeden ze 4 druhů kvasinek (červená: *C. krusei* I1-CAKR-06, modrá: *C. guilliermondii* I1-CAGU-22, černá: *C. tropicalis* I3-CATR9-17, zelená: *C. pelliculosa* I3-CAPE3-04).

#### IV. 3. 2 Vliv změny techniky extrakce DNA na výsledek McRAPD

Pro srovnání byla kromě metody hrubých lyzátů (kap. III. 2. 3. 1) také testována extrakce DNA pomocí komerční soupravy (kap. III. 2. 3. 2), která je určena přímo pro extrakci DNA z kvasinek a plísní a jejíž princip je založen na adsorpci DNA na silikát. DNA vybraných kmenů byla paralelně připravena oběma způsoby (hrubé lyzáty a komerční souprava), výsledky jsou uvedeny na obrázku 12.



Obr. 12 – Srovnání výsledků McRAPD dosažených s templátovou DNA získanou pomocí metody hrubých lyzátů kolonií a komerční soupravy

A) normalizované křivky tání, B) derivované křivky tání, C) fingerprinty – vždy v levé dráze výsledek s DNA získanou pomocí komerční soupravy, v pravé výsledek získaný technikou hrubých lyzátů.

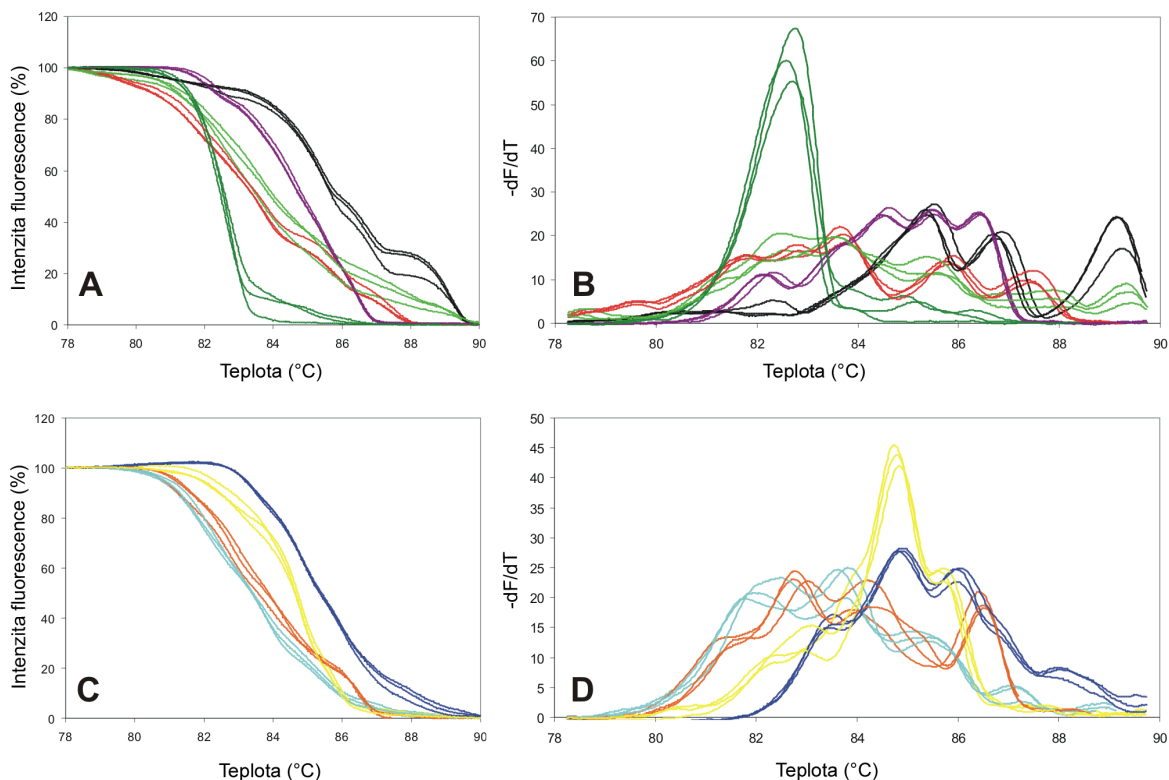
Dráha 1 a 20: DNA marker 200–1500 bp; dráha 2–3 a černá *C. lusitanae* I1-CALU-33; dráha 4–5 a fialová *C. guilliermondii* I1-CAGU2-20; dráha 6–7 a modrá *C. pelliculosa* I3-CAPE3-10; dráha 8–9 a žlutá *S. cerevisiae* I3-SACE3-37; dráha 10–11 a oranžová *C. metapsilosis* I1-CAME7-11; dráha 12–13 a tmavě zelená *C. tropicalis* I3-CATR9-22; dráha 14–15 a světle zelená *C. krusei* I1-CAKR-24; dráha 16–17 a tyrkysová *C. glabrata* I1-CAGL-39; dráha 18–19 a červená *C. albicans* ATCC 76615.

Počáteční intenzita fluorescence křivek tání při použití templátové DNA získané pomocí komerční soupravy byla ve většině případů stejná nebo vyšší ve srovnání s párátkovou metodou, což poukazuje na vyšší výtěžek DNA. U 8 z 9 sledovaných druhů se křivky tání téměř nelišily, přestože lze vysledovat drobné odchylky v intenzitě pruhů. U *C. glabrata* byly výsledky extrakce komerční soupravou zjevně lepší, extrakcí dle Steffan a kol. (1997) se nedosáhlo v tomto případě optimálního výsledku. Každá izolační technika může čas od času selhat, komerční souprava obecně může nabídnout lépe reprodukovatelné výsledky i pro méně zkušený personál. Jako ukazatel nedostatečně provedené izolace může posloužit sledování hodnoty počáteční intenzity fluorescence křivek tání, která má dosáhnout hodnoty minimálně 15 při nastavení standardního 30% výkonu LE diody v protokolu tání, v opačném případě se doporučuje pro dosažení věrohodných výsledků extrakci zopakovat. Průběh křivek tání jednotlivých druhů se však při použití obou srovnávaných extrakčních metod významně nelišil (Obr. 12).

Techniku extrakce je obecně nutné optimalizovat v každé laboratoři, výsledek může ovlivnit zdroj zymolyázy, zkušenost personálu, apod. Přidání příliš mnoha buněk vede k nedostatečné lýze a vysoké koncentraci PCR inhibitorů. Naproti tomu přebytek zymolyázy může být zdrojem kontaminující DNA, které se v průběhu výroby enzymu nelze zcela vyhnout a která následně může interferovat s DNA vzorku, jelikož primery užívané při RAPD mají schopnost nasedat na jakoukoli cílovou DNA. S výjimkou selhání v jednotlivé extrakci DNA u *C. glabrata*, kterou bylo možné odhalit na základě kritéria minimální počáteční fluorescence vzorku, ovšem nebyly pozorovány zřetelné rozdíly ve výsledcích při použití techniky hrubých lyzátů ve srovnání s referenční extrakcí DNA komerční soupravou. Protože extrakce DNA komerční soupravou je časově výrazně náročnější a především několikanásobně dražší, pro další pokusy byla jako postačující zvolena technika hrubých lyzátů (párátková metoda).

#### IV. 3. 3 Opakovatelnost jednotlivých běhů

Variabilita výsledků McRAPD mezi různými běhy amplifikace a krátkodobá stabilita hrubých lyzátů při -20 °C byla ověřena ve třech následujících dnech, kdy byla vždy s tímto hrubým lyzátem kolonie provedena nová amplifikační reakce. Nebyly sledovány žádné větší rozdíly (Obr. 13), což poukazuje na dobrou opakovatelnost McRAPD v rámci jedné laboratoře.



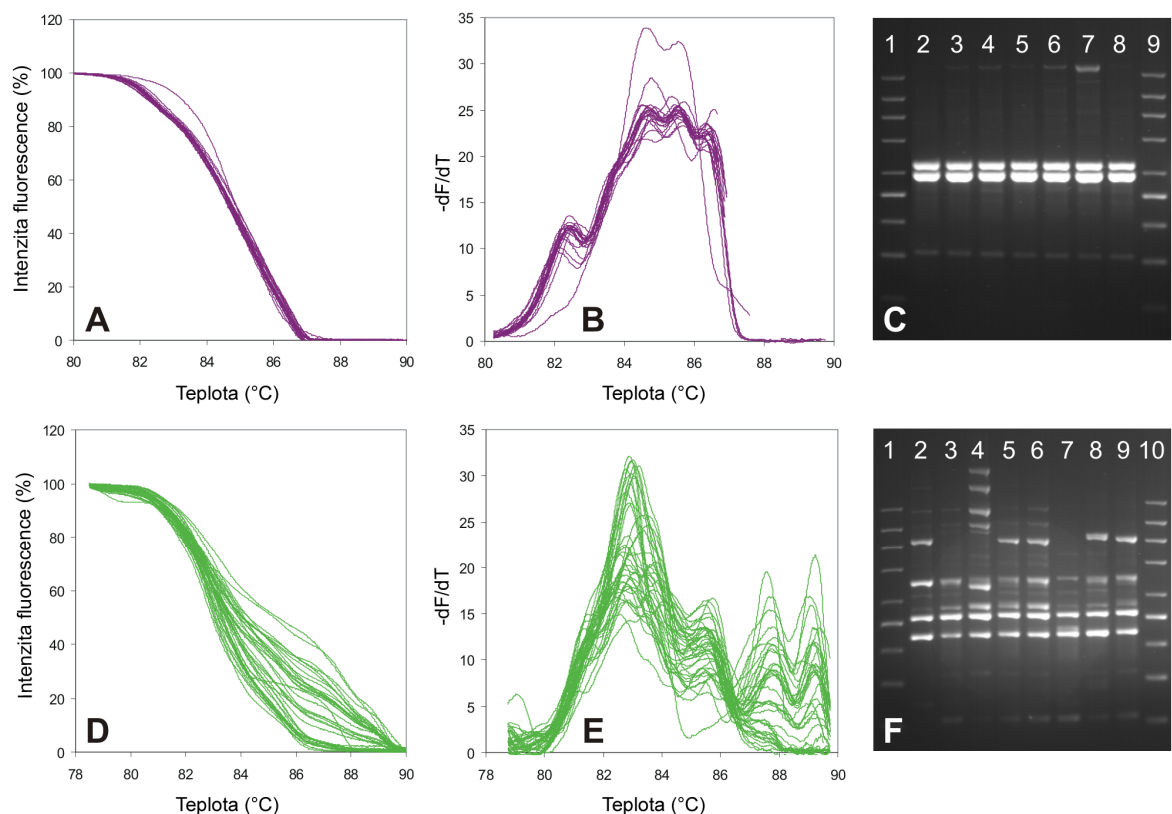
Obr. 13 – Vliv drobných odchylek v reakčních podmínkách mezi jednotlivými běhy na variabilitu výsledků McRAPD a současné ověření krátkodobé stability hrubých lyzátů

A) a C) normalizované křivky tání, B) a D) derivované křivky tání. Barevné rozlišení křivek: Červená *C. albicans* I1-CAAL2-38, černá *C. lusitaniae* I1-CALU2-32, fialová *C. guilliermondii* I1-CAGU2-21, světle zelená *C. krusei* I3-CAKR2-18, tmavě zelená *C. tropicalis* I3-CATR9-13 (vše v částech A a B); oranžová *C. parapsilosis* I1-CAPA7-28, modrá *C. pelliculosa* I3-CAPE3-04, žlutá *S. cerevisiae* I1-SACE2-40, tyrkysová *C. glabrata* I3-CAGL2-15 (vše v částech C a D).

#### IV. 3. 4 Vliv vnitrodruhové variability

Přestože McRAPD byla optimalizována pro druhovou identifikaci kvasinek, různé kmeny téhož druhu produkovaly podobné, ne však zcela identické soubory amplifikačních produktů. Rozdíly mezi fingerprinty a polohou a průběhem křivek tání u různých kmenů jednoho druhu byly však mnohem menší než mezi různými druhy kvasinek. Nejvyšší vnitrodruhová variabilita byla pozorována u *C. krusei*, naopak nejmenší u *C. guilliermondii*. Jak je patrné z obrázku 14, přestože se křivky tání nejvariabilnějšího druhu *C. krusei* polohově významně liší, na tvaru křivek a tedy poloze píků derivovaných křivek se to prakticky neprojevuje, liší se pouze jejich výška. Lze předpokládat, že druhy poskytující jednoduchý fingerprint s pouze jedním či dvěma silnějšími pruhy budou vykazovat méně variabilní křivky tání než druhy poskytující složitý fingerprint s řadou pruhů různé intenzity, což dokládá obrázek 14 (část C a F), kde je vybráno několik kmenů *C. guilliermondii* a *C. krusei*. Tento obrázek rovněž ilustruje, že uniformní krátké RAPD produkty rozhodují

o průběhu tání v první části křivek u *C. krusei* (78–82,5 °C), zatímco variabilnější dlouhé RAPD produkty se odrážejí v průběhu druhé části křivek tání (82,5–90 °C). Jak bylo již dříve publikováno, jednotlivé druhy kvasinek mohou vykazovat i velmi rozdílný stupeň vnitrodruhové genetické variability (Tavanti et al., 2005a; Jacobsen et al., 2008). Ačkoliv byla metoda McRAPD uzpůsobena tak, aby se dosáhlo vysoké uniformity výsledků v rámci jednoho druhu, některé ze studovaných druhů neprodukovaly jednotný McRAPD profil. Této nevýhody se dá i využít, protože zároveň s identifikací některých druhů lze získat informace o jejich příslušnosti k určitému genotypu.



Obr. 14 – Ukázka vnitrodruhové variability výsledků McRAPD u nejméně variabilního druhu *C. guilliermondii* (A, B a C) a u nejvíce variabilního druhu *C. krusei* (D, E a F)

A a D normalizované křivky tání, B a E derivované křivky tání všech izolátů v souboru, C a F fingerprinty s molekulárním markerem 200–1500 bp v drahách 1 a 9, příp. 10 a s vybranými izoláty. Dráha 2: I1-CAGU2-35, dráha 3: I1-CAGU2-34, dráha 4: I1-CAGU2-33, dráha 5: I1-CAGU2-32, dráha 6: I1-CAGU2-31, dráha 7: I1-CAGU2-30, dráha 8: I1-CAGU2-29 (vše *C. guilliermondii*) část (C); dráha 2: I3-CAKR2-33, dráha 3: I3-CAKR2-32, dráha 4: I3-CAKR2-31, dráha 5: I3-CAKR2-30, dráha 6: I3-CAKR2-29, dráha 7: I3-CAKR2-28, dráha 8: I3-CAKR2-27, dráha 9: I3-CAKR2-26 (vše *C. krusei*) část (F).



## IV. 4 Výsledky identifikace u zvoleného souboru kmenů

### IV. 4. 1 Definice genotypů

Pro zhodnocení přesnosti McRAPD v druhové identifikaci bylo vybráno 9 druhů kvasinek (viz kap. III. 1. 1), které jsou v našich podmínkách nejčastěji izolovány z klinických vzorků. Protože systém má sloužit pro speciaci širšího spektra kvasinek, byl použit primer, který poskytuje přiměřeně komplexní fingerprint stabilní v čase. Profily tání McRAPD a RAPD fingerprinty jsou do jisté míry polymorfní, což odráží přítomnost spektra pruhů různé intenzity a polohy, ale existuje určitý menší počet profilů, které definují druh.

McRAPD data všech izolátů byla srovnána softwarem QAS a následně byla vyhodnocena pomocí hierarchické shlukové analýzy na základě vzájemné párové podobnosti jednotlivých profilů tání (viz kap. III. 2. 7). Izoláty náležející k jednotlivým druhům byly následně seskupeny v kladogramu, který naznačuje genetické vztahy mezi nimi (viz příloha C). U některých druhů ve struktuře kladogramu bylo možné identifikovat skupinky izolátů, které tvořily jasné klastry. Po posouzení vizuální podobnosti křivek a fingerprintů v klastrech byla empiricky zvolena hranice (svislá červená linie na obrázcích v příloze C), která vymezuje zřetelně odlišné genotypy daného druhu. Ty byly označeny abecedně dle četnosti zastoupení v našem souboru izolátů. Kmeny patřící k určitému genotypu jsou v dendrogramu vždy podkresleny toutéž barvou shodnou s barvou křivek v souvisejících profilech tání. Kmeny, které nebyly přiřazeny k žádnému genotypu, nejsou barevně zvýrazněny (černé křivky v profilech tání).

Data McRAPD z celého souboru izolátů byla srovnána a byly vybrány izoláty, jejichž křivky tání se zcela vymykaly ostatním křivkám daného druhu. U těchto sporných případů bylo často možné nalézt podobnou křivku tání v databázi dat McRAPD a navrhnout na základě toho novou identifikaci, někdy se však jednalo o unikátní křivky a nemohla být tedy navržena žádná alternativní identifikace. Správná identifikace byla ověřena na základě porovnání RAPD fingerprintů komerčním softwarem GelCompar II. Čtyři izoláty, které byly původně identifikovány jako *C. parapsilosis* a jejichž identifikace byla zpochybněna vzhledem k netypickému průběhu křivky tání, byly na základě klasického zhodnocení podobnosti RAPD fingerprintů jednoznačně ztotožněny s referenčními kmeny *C. metapsilosis* (viz kap. IV. 6).

Příslušnost ostatních 12 sporných izolátů byla dodatečně otestována komerční soupravou asimilačních testů ID 32C (bioMérieux, Francie). Výsledky identifikace jsou shrnuty v tabulce 3. V případě devíti kmenů, kde se shodla nová identifikace navržená McRAPD s identifikací pomocí fingerprintů, ID 32C určila kmen také ve prospěch McRAPD. U tří kmenů, kde McRAPD nenavrhl žádnou alternativní identifikaci,

identifikovala ID 32C kmen ve prospěch výsledku konvenční fenotypové identifikace. Lze usuzovat, že v těchto případech se pravděpodobně jedná o jediného příslušníka dalšího genotypu v daném souboru nebo by se mohlo jednat o zástupce vzácného druhu, který je konvenční diagnostikou obtížně identifikovatelný. Vzácnější druhy dokonce nebývají zahrnuty v databázích dodávaných s běžně používanými komerčními soupravami. Například jako *C. guilliermondii* může být mylně identifikována *C. famata* nebo *C. fermentatii* (San Millán et al., 1997; Lockhart et al., 2009). Značná část izolátů považovaná za *C. pelliculosa* může být ve skutečnosti *C. fabianii* nebo *C. utilis*, jak je také doloženo v publikacích Bhally a kol. (2006) a Hamal a kol. (2008). Dodatečná konfirmace pomocí ID 32C se také prováděla v případě *C. lusitaniae*, u které byl zjištěn největší počet různých genotypů. Byli vybráni zástupci všech čtyř genotypů, u kterých bylo vzápětí potvrzeno, že se jedná skutečně o příslušníky tohoto druhu.

**Tabulka 3 – Souhrn sporných výsledků identifikace**

Izoláty, u kterých se vyskytl rozpor mezi McRAPD a konvenční diagnostikou, byly podrobeny identifikaci pomocí komerční soupravy ID 32C. Modrým tiskem je zvýrazněn správný výsledek identifikace, červeným tiskem chybná nebo nejednoznačná identifikace (? = technika nenavrhlá jednoznačný výsledek identifikace).

Kmen	Konvenční identifikace	McRAPD identifikace	ID 32C identifikace
I3-CAKR2-35	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
I3-CATR9-32	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
I3-CATR9-09	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
I3-SACE3-07	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
I3-SACE3-26	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
I1-CAGU2-25	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
I1-CAGU2-26	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
I1-CAGU2-27	<i>Candida guilliermondii</i>	?	<i>Candida guilliermondii</i>
CCY 29-4-21	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
I1-CAPE2-35	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
I1-CAPE2-36	<i>Candida pelliculosa</i>	?	<i>Candida pelliculosa</i>
CCY 29-6-7	<i>Candida pelliculosa</i>	?	<i>Candida pelliculosa</i>

V případech, kdy došlo na základě dodatečné verifikace rozporných identifikací ke změně původního zařazení kmene, jsme neměnili kódové označení izolátu, pod kterým je uložený ve sbírce a který v sobě zahrnuje původní druhovou zkratku, ale na všech místech, kde se toto označení vyskytuje, jsme změnu vyznačili šipkou, např. I3-CAKR2-35 → CAPA.

#### IV. 4. 2 Vyhodnocení správnosti identifikace pomocí McRAPD – použití různých přístupů

Podoba dat z analýzy tání nabízí možnost numerického vyhodnocení výsledků McRAPD s potenciálem automatizace. Pro toto vyhodnocení byly ověřovány různé přístupy uvedené dále. Tyto přístupy byly testovány na vybraném souboru izolátů tak, že křivka tání každého izolátu zahrnutého do souboru byla považována pracovníě za neznámý vzorek, byla provedena jeho identifikace každým testovaným přístupem a výsledek se srovnal se správným výsledkem identifikace. Jako referenční přístup je uvedena tradiční RAPD identifikace na základě srovnání fingerprintů (dendrogram všech testovaných izolátů je uveden v příloze D), protože tato metoda selhala pouze u dvou izolátů (*C. glabrata* CCY 26-20-21 a *C. guilliermondii* I1-CAGU2-27, které jsou v dendrogramu označeny šipkou) z celkového počtu 322.

##### IV. 4. 2. 1 Automatizovaná identifikace neznámého izolátu na základě přiřazení k druhu s nejméně odlišným průběhem tání

Jako nejjednodušší přístup pro identifikaci se jevílo numerické srovnání křivky tání neznámého izolátu s křivkami tání známých izolátů a přiřazení neznámého izolátu k druhu, se kterým vykazuje nejnižší rozdíl. Postup numerického vyjádření podobnosti mezi křivkami tání páru izolátů je popsán v kapitole III. 2. 7, včetně automatizace tohoto postupu. Protože by ale bylo v rutinním provozu obtížně proveditelné srovnávání křivky neznámého izolátu se všemi křivkami dříve testovaných izolátů, byl nejdříve vypočten pro každý definovaný druh/genotyp průměrný průběh křivky tání. Jak je blíže popsáno v kapitole III. 2. 7, na základě automatického výpočtu rozdílů mezi křivkami tání lze data neznámého izolátu porovnat se sadou známých McRAPD dat a nalézt mezi nimi profil s průběhem tání nejméně odlišným od testovaného izolátu. Výsledkem automatického zpracování je tedy dendrogram, kde je neznámý izolát zařazen k druhu/genotypu s nejbližším profilem tání. Tento jednoduchý a potenciálně plně automatizovatelný přístup vykázal v průměru 80% přesnost identifikace u všech izolátů z testovaného souboru, u různých druhů se míra přesné identifikace pohybovala mezi 59 % (*C. glabrata*) a 100 % (*C. tropicalis*) (Tab. 4).

**Tabulka 4 – Míra správné identifikace izolátů při použití různých přístupů k interpretaci McRAPD dat**

Automatická identifikace představuje postup automatického vyhledávání nejmenšího rozdílu mezi normalizovanými křivkami tání neznámého vzorku a databází průměrných křivek jednotlivých druhů/genotypů programem QAS, dvoustupňová identifikace představuje tentýž přístup následovaný kontrolou teplot tání rozhodných píků, vizuální identifikace představuje postup vizuálního porovnávání shodnosti derivovaných výnosů křivek tání a v posledním sloupci jsou uvedeny výsledky získané referenční metodou srovnávání RAPD fingerprintů.

Druh	Počet izolátů	Správná identifikace ( % )			
		Automatická identifikace	Dvoustupňová identifikace	Vizuální identifikace	Srovnávání fingerprintů
<i>C. albicans</i>	44	63,6	72,7	100,0	100,0
<i>C. glabrata</i>	41	58,5	82,9	97,6	97,6
<i>C. krusei</i>	39	64,1	82,1	97,4	100,0
<i>C. tropicalis</i>	40	100,0	97,5	100,0	100,0
<i>C. parapsilosis</i>	38	73,7	78,9	100,0	100,0
<i>C. lusitaniae</i>	41	97,6	97,6	100,0	100,0
<i>S. cerevisiae</i>	39	89,7	92,3	100,0	100,0
<i>C. guilliermondii</i>	19	94,7	94,7	94,7	94,7
<i>C. pelliculosa</i>	17	88,2	82,4	82,4-88,2	100,0
<i>C. metapsilosis</i>	4	75,0	100,0	100,0	100,0
<b>Všechny druhy</b>	<b>322</b>	<b>79,5</b>	<b>86,7</b>	<b>98,1-98,4</b>	<b>99,4</b>

#### IV. 4. 2. 2 Dvoukroková identifikace zohledňující píky tání

Protože přesnost druhové identifikace dosažená jen plně automatickým numerickým srovnáním nebyla uspokojivá, nabízelo se dále zvýšit přesnost identifikace zohledněním polohy píků u derivovaných křivek tání, protože ty nesou navíc informaci o změnách tvaru křivek tání. Pro tento účel bylo ale nejdříve nutné definovat průměrnou polohu každého píku a posoudit u každého píku, zda má jeho výskyt skutečnou vypovídací hodnotu pro přiřazení neznámého izolátu ke konkrétnímu druhu. Proto byl nejdříve vypočten průběh průměrné derivované křivky pro každý druh a genotyp (příloha E), v této křivce byly identifikovány všechny píky vyskytující se u izolátů daného druhu/genotypu a určeny průměrné hodnoty teplot tání/vrcholů těchto píků. Píky byly poté klasifikovány dle významnosti pro identifikaci do tří skupin (i) rozhodné píky, které byly přítomny u všech izolátů daného druhu/genotypu, (ii) charakteristické píky přítomné u 75–99 % izolátů a (iii) možné píky, které se vyskytly u 20–74 % izolátů (Příloha F). Tímto byl

získán přehled o tom, které píky jsou pro daný druh/genotyp typické. Následně byl aplikován dvoukrokový postup identifikace – v prvním kroku byl automaticky přiřazen neznámý izolát ke druhu/genotypu s nejbližším profilem tání stejným způsobem jak je popsáno výše a ve druhém kroku byla u izolátu ověřena přítomnost rozhodného píku pro tento druh/genotyp, zda je ve shodě s identifikací navrženou prostou numerickou identifikací. Pokud pozice posuzovaného píku spadala do intervalu aritmetického průměru typického rozhodného píku s rozmezím daným dvounásobkem směrodatné odchylky, identita izolátu byla potvrzena. V opačném případě byl výsledek prosté numerické identifikace vyhodnocen jako nesprávný a stejnému hodnocení byla podrobena druhá nejbližší možnost zařazení navržená prostou numerickou identifikací. Tímto dvoustupňovým poloautomatizovaným procesem identifikace bylo správně určeno 87 % izolátů, u různých druhů v rozmezí od 73 % (*C. albicans*) do 100 % (*C. metapsilosis*). U některých druhů tento postup přinesl výrazné zlepšení, například v rámci druhu *C. glabrata* bylo identifikováno jednostupňově správně jen 59 % izolátů a dvojestupňově 83 % izolátů. Naopak u dvou druhů (*C. tropicalis* a *C. pelliculosa*) došlo překvapivě k mírnému zhoršení míry přesné identifikace, což může být vysvětleno použitím kritéria dvounásobku směrodatné odchylky od aritmetického průměru polohy píku. Tento interval ale statisticky postihuje jen 95 % izolátů, takže ve druhém kroku mohou být izoláty přiřazeny chybně k jinému druhu, který má blízko položený rozhodný pík, přestože první krok identifikace byl i při poloze píku mimo tento 95% interval správný.

#### IV. 4. 2. 3 Identifikace na základě vizuálního hodnocení podobnosti derivovaných křivek

Protože ani při dvoukrokové identifikaci nebylo dosaženo míry identifikace tradiční RAPD (99,4 %), byla hledána další cesta k interpretaci informací obsažených v McRAPD datech. Jako slibná varianta se nabízelo vizuální srovnání derivované křivky tání neznámého izolátu s databází derivovaných křivek známých vzorků. Grafický výnos derivované křivky totiž reflektuje nejen polohu křivky, ale také její tvar. Pro usnadnění postupu byly nejprve v programu Microsoft Excel 2007 na jednotlivé listy graficky vyneseny derivované křivky všech testovaných izolátů jednotlivých druhů/genotypů jako tenké linie. McRAPD data testovaného izolátu byla importována na první list a automaticky vykreslována v následujících listech silnou čarou na podklad slabých čar známých vzorků (viz příklad v příloze G). Následně byly vizuálně zkoumány grafické výnosy a byla subjektivně posuzována míra shody neznámé silně proložené křivky s křivkami zástupců všech druhů/genotypů. I když graf konkrétního druhu při tomto postupu pochopitelně obsahoval vždy také křivku testovaného – modelově neznámého – izolátu, vykreslenou tenkou čarou, nebylo tím hodnocení zkresleno, protože tenká čára

byla po importu dat vždy okamžitě překreslena silnou čarou. Vyhodnocení prováděly nezávisle na sobě dvě osoby zaslepeným způsobem, neměly tedy informace o identitě vzorků, jejichž pořadí bylo generováno náhodně. Nakonec třetí osoba vyhodnotila správnost identifikace provedené těmito dvěma osobami na základě klíče k randomizaci pořadí vzorků. Výsledky této identifikace byly výborné a překvapivě jednotné - první osoba identifikovala správně 98,1 % a druhá osoba 98,4 % vzorků, což se téměř shoduje s výsledkem dosaženým tradiční RAPD. Tento výsledek znamená, že v jednom případě bylo chybně identifikováno 5 vzorků a ve druhém 6 vzorků z celkového počtu 322 vzorků, přičemž v pěti případech se chyby obou osob shodovaly (Tab. 5). To naznačuje, že se nejednalo o náhodnou chybu vyhodnocujících osob, ale spíše o nepřítomnost charakteristických znaků v profilech tání nesprávně určených vzorků. Při podrobnějším prozkoumání odpovídajících klasických RAPD fingerprintů (viz Příloha D) se zjistilo, že jeden ze vzorků (*C. guilliermondii* I1-CAGU2-27) byl rovněž tradiční RAPD chybně zařazen k jinému druhu. Další dva izoláty (zástupci druhu *C. pelliculosa* I1-CAPE2-36 a CCY 29-6-7) vykazovaly netypické fingerprinty a při RAPD identifikaci tvořily samostatný shluk mimo shluk ostatních izolátů *C. pelliculosa*.

**Tabulka 5 - Souhrn nesprávně identifikovaných izolátů na základě vizuálního hodnocení podobnosti derivovaných křivek**

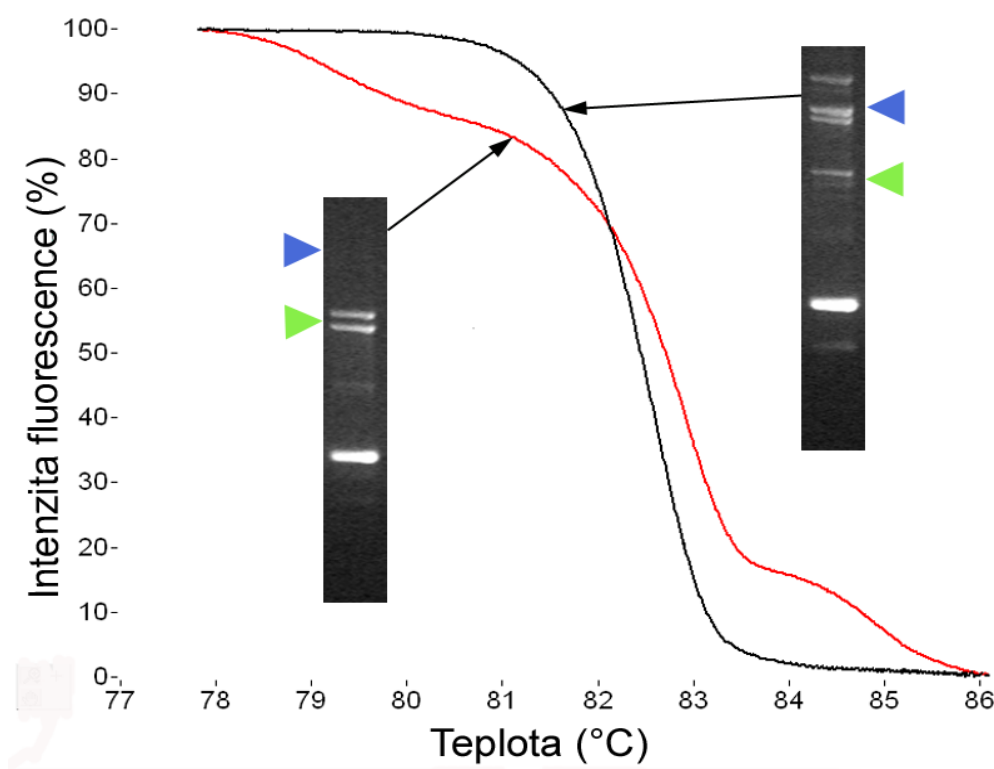
1. osoba	2. osoba
I1-CAPE2-36	I1-CAPE2-36
CCY 29-6-7	CCY 29-6-7
I1-CAGU2-27	I1-CAGU2-27
I3-CAGL3-12	I3-CAGL3-12
ATCC 90878	ATCC 90878
---	I3-CAPE3-05

## IV. 5 Vnitrodruhová typizace významné patogenní kvasinky *C. tropicalis*

### IV. 5. 1 Genotypy *C. tropicalis*

Již dříve bylo publikováno, že mezi kmeny *C. tropicalis* existuje určitá genetická diverzita. Například Kanbe a kol. (2002) prokázal na základě identifikace pomocí genu pro DNA topoizomerázu II, že existují dva odlišné genotypy *C. tropicalis*. Také při MLST typizaci založené na sekvenčním polymorfizmu fragmentů šesti genů (ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, XYR1, ZWF1a) se vyčlenil klastř flukonazol-rezistentních izolátů (Tavanti et al., 2005b).

Při McRAPD analýze souboru izolátů *C. tropicalis* bylo možné podle rozlišit dva poměrně výrazně vyhraněné genotypy. Odlišnost je patrná jak podle profilu křivek tání produktů RAPD, tak podle elektroforetického dělení těchto produktů (Obr. 15). Pro minoritní genotyp byl charakteristický dvojpruh pruhů kolem 900 bp, který je označen na obrázku 15 zelenou šipkou, naopak chybí pruhy vyšší molekulové hmotnosti, což je naznačeno modrou šipkou. K minoritnímu subtypu byly přiřazeny kmeny I3-CATR9-07, I3-CATR9-16, I3-CATR9-19, I3-CATR9-22 a I3-CATR9-36, tedy 5 ze 40 testovaných izolátů *C. tropicalis*.



Obr. 15 – Charakteristický profil McRAPD a odpovídající fingerprint u minoritního (červená křivka tání) a majoritního (černá křivka tání) subtypu *C. tropicalis*

Zelená a modrá šipka označují rozdílné rozložení pruhů ve fingerprintech obou subtypů.

#### IV. 5. 2 Asociace genotypu s citlivostí k antimykotikům

*C. tropicalis* je jedním ze tří nejčastěji izolovaných NAC druhů a současně je spojena s nejvyšší úmrtností z NAC druhů (Krcmery et Barnes, 2002), vyskytuje se především u onkologických pacientů. Původně se uvádělo, že je *C. tropicalis* citlivá na flukonazol i amfotericin B, ale v poslední době se stále častěji objevují zprávy o kmenech rezistentních na tato antimykotika (Rex et al., 1995b; Blumberg et Reboli, 1996).

Lze předpokládat, že majoritní a minoritní genotypy *C. tropicalis* by se mohly lišit některými vlastnostmi. Při orientačním testování *in vitro* citlivostí k antimykotikům pomocí soupravy ABT Fungus 2 INT (bioMérieux, Francie) se zjistilo, že minoritní genotyp se uniformně vyznačuje nejnižšími hodnotami MIC pro 5-FC ( $\leq 0,5$  mg/l), oproti tomu majoritní genotyp je na 5-FC rezistentní (typicky MIC  $\geq 32$  mg/l). U ostatních antimykotik nebyly zaznamenány zřetelné rozdíly mezi citlivostí genotypů. Tento poznatek by mohl mít klinický význam, protože výsledek McRAPD identifikace by mohl sloužit v některých případech jako rychlý ukazatel citlivosti izolátu k antimykotikům. V současné době probíhá na základě těchto předběžných výsledků rozsáhlejší genotypizace *C. tropicalis*. Výsledek je zajímavý i proto, že typizační studie založená na kmenech *C. tropicalis* převážně ze západoevropských zemí (Law et al., 1996; Tavanti, 2005b; Desnos-Ollivier et al., 2008) prokázala rezistenci k flucytozinu u minoritního klastru izolátů a majorita byla naopak citlivá. Předběžná data naproti tomu ukazují, že převažující genetická charakteristika populace *C. tropicalis* ve vztahu k citlivosti na flucytozin může být v našem geografickém prostoru zcela odlišná.



#### IV. 6 Rozlišení kryptických druhů *C. parapsilosis* pomocí McRAPD

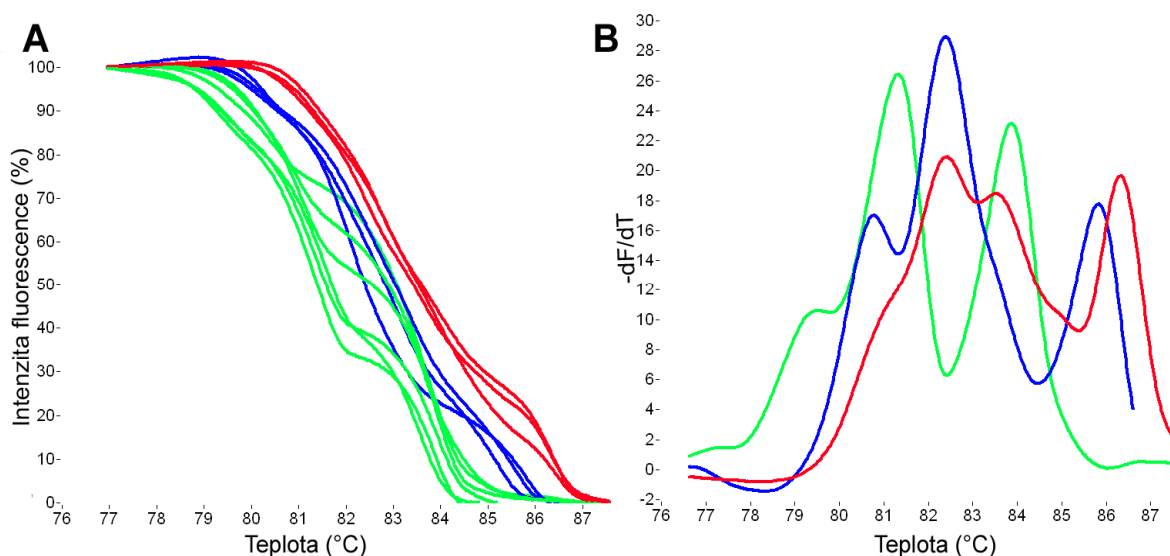
Ačkoli se *C. parapsilosis* jeví při identifikaci konvenčními diagnostickými metodami jako fenotypově uniformní druh, při molekulární typizaci kmenů metodami RFLP, RAPD, PFGE nebo sekvenováním ITS (Scherer et Stevens, 1987; Lehmann et al., 1992; Lin et al., 1995) se zjistilo, že *C. parapsilosis* je oproti jiným druhům kandid poměrně geneticky heterogenní. To vedlo k rozdělení izolátů *C. parapsilosis* do tří genotypů/poddruhů, označovaných jako skupina I, II a III (Lin et al., 1995). Nyní jsou skupiny II a III na základě významných rozdílů zjištěných při MLST analýze a fylogenetických analýzách sekvence ITS1 považovány za dva velmi blízké příbuzné, ale samostatné nové druhy *C. parapsilosis* a *C. orthopsilosis* (Tavanti et al., 2005c). Klinický význam těchto kryptických druhů prozatím zůstává neobjasněn. Přestože zástupci kmenů každého z těchto tří druhů bývají nalézáni ve vzorcích klinického materiálu, incidence *C. parapsilosis* podstatně převažuje (Lin et al., 1995; Enger et al., 2001; Lockhart et al., 2008), což naznačuje, že se snadněji přenáší mezi lidmi nebo je lépe přizpůsobena komenzálnímu způsobu života. Některé studie poukázaly na neschopnost produkce biofilmu u většiny studovaných kmenů *C. metapsilosis* a *C. orthopsilosis* (Song et al., 2005; Tavanti et al., 2007). Také se zdá, že se jednotlivé druhy mohou lišit citlivostí k antimykotikům (Gomez-Lopez et al., 2008; Van Asbeck et al., 2008). Sekvenční analýza několika genových fragmentů ukazuje, že u *C. parapsilosis* je narozdíl od *C. orthopsilosis* a *C. metapsilosis* velmi malá mezikmenová sekvenční variabilita (Tavanti et al., 2005c).

Při McRAPD analýze (viz kap. IV. 4. 1) se ze skupiny izolátů *C. parapsilosis* vymykaly kmeny I3-CAPA7-11, I3-CAPA7-18, I3-CAPA7-26, I3-CAPA7-27, a to jak profilem křivek tání produktů RAPD, tak fingerprintem produktů po elektroforetickém dělení. Opakovaná identifikace těchto kmenů komerčním setem ID 32C však potvrdila jejich příslušnost k druhu *C. parapsilosis*. Bylo tedy pravděpodobné, že by se mohlo jednat o kmeny *C. orthopsilosis* nebo *C. metapsilosis*. Proto byly pro srovnání za účelem potvrzení identity získány referenční kmeny uvedené v tabulce 6, jejichž druhová příslušnost byla potvrzena molekulárně-genetickými metodami – buď sekvenováním mitochondriálního genomu (Rýčovská et al., 2004) nebo pomocí RAPD dle Tavanti a kol. (2005c). Dále byly do srovnání zahrnuty kmeny I3-CAPA7-13 a I3-CAPA7-25, které v předchozím pokusu vykazovaly křivky tání a fingerprint charakteristický pro *C. parapsilosis*.

**Tabulka 6 – Seznam referenčních kmenů *C. metapsilosis* a *C. orthopsilosis* a způsob jejich identifikace**

Označení kmenu	Druhové zařazení	Způsob identifikace
CBS 2916	<i>C. metapsilosis</i>	sekvenace
MCO 448	<i>C. metapsilosis</i>	sekvenace
MCO 456	<i>C. orthopsilosis</i>	sekvenace
CBS 640	<i>C. parapsilosis</i>	sekvenace
I1-CAOP-02	<i>C. orthopsilosis</i>	RAPD
I1-CAOP-03	<i>C. orthopsilosis</i>	RAPD

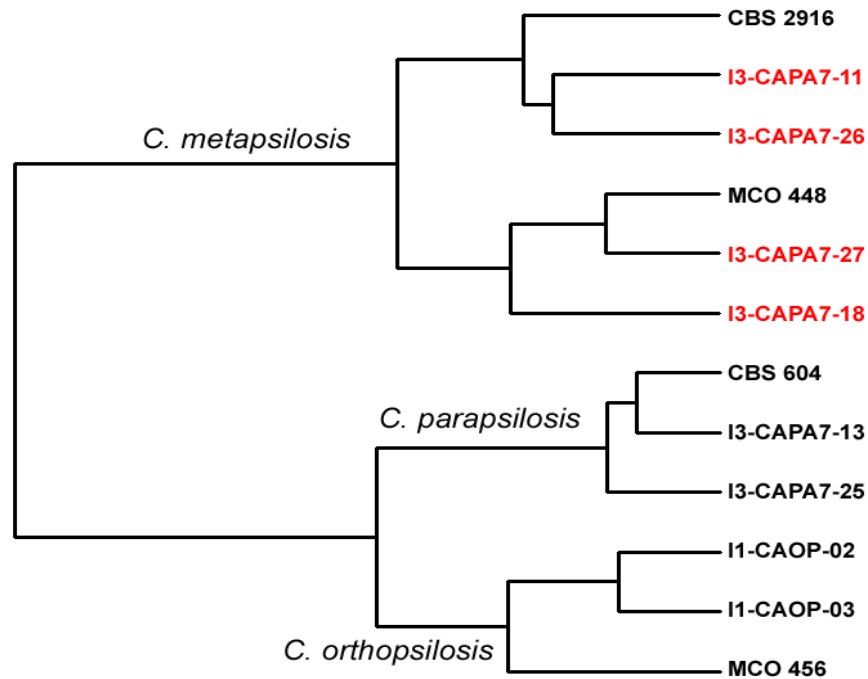
Profily křivek tání jednotlivých kmenů v normalizované i derivované podobě získané analýzou McRAPD jsou uvedeny na obrázku 16. Na základě dat o průběhu křivek tání RAPD produktů byl postupem dle kapitoly III. 2. 7 zpracován dendrogram (Obr. 17), který potvrzuje, že metodou McRAPD je možné jednotlivé druhy jednoznačně rozlišit. Fingerprinty i poloha křivek tání izolátů *C. metapsilosis* byly oproti izolátům *C. parapsilosis* poměrně heterogenní, přesto všechny testované izoláty vykazovaly jednotný profil derivovaných křivek tání.



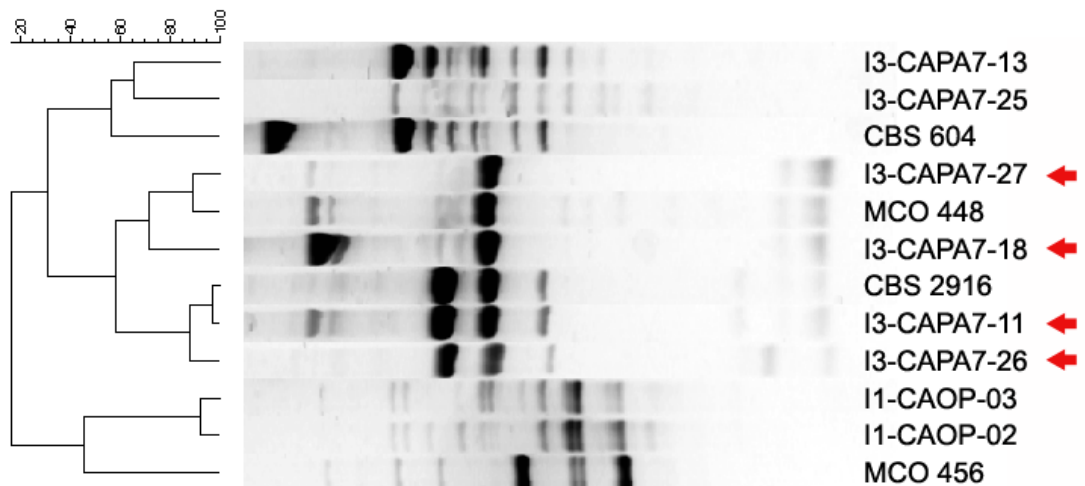
Obr. 16 – Normalizované (A) a derivované (B) křivky tání získané McRAPD analýzou izolátů *C. parapsilosis* (červené křivky), *C. orthopsilosis* (modré křivky) a *C. metapsilosis* (zelené křivky). V části B byla pro větší přehlednost vybrána vždy jen jedna křivka typická pro daný druh. Rozhodné píky pro jednotlivé druhy: *C. metapsilosis*: 81,2 °C a 83,8 °C; *C. orthopsilosis*: 80,8 °C, 82,7 °C a 85,5 °C; *C. parapsilosis*: 82,7 °C a 86,3 °C.

Pro srovnání byl též sestaven dendrogram vycházející z poloh pruhů po elektroforéze produktů RAPD (Obr. 18). Oranžovými šipkami jsou označeny izoláty konvenční metodou identifikované jako *C. parapsilosis*, které ale byly v dendrogramu

zařazeny do klastru *C. metapsilosis*. K dispozici bylo bohužel omezené množství izolátů, využití McRAPD jako perspektivního nástroje pro rozlišování kryptických druhů *C. parapsilosis* bude potřeba ověřit i na větším souboru kmenů.



Obr. 17 – Dendrogram odvozený od matice, která vznikla z vypočtených hodnot koeficientů rozdílnosti McRAPD profilů jednotlivých izolátů. Červeně jsou zvýrazněny izoláty, které byly tradiční fenotypovou identifikací chybně určeny jako *C. parapsilosis*.



Obr. 18 – Dendrogram fingerprintů sestavený v programu GelCompar II metodou UPGMA s koeficienty vypočtenými dle Jaccarda s 1% tolerancí v poloze pruhů. Šipky označují 4 kmeny původně identifikované jako *C. parapsilosis*. Při srovnání s referenčními kmeny *C. parapsilosis* (CBS 604), *C. orthopsilosis* (MCO 456) a *C. metapsilosis* (CBS 2916 a MCO 448) byly však jednoznačně přiřazeny do shluku *C. metapsilosis*.

#### IV. 7 Typizace izolátů *C. lusitaniae* k potvrzení kmenové identity

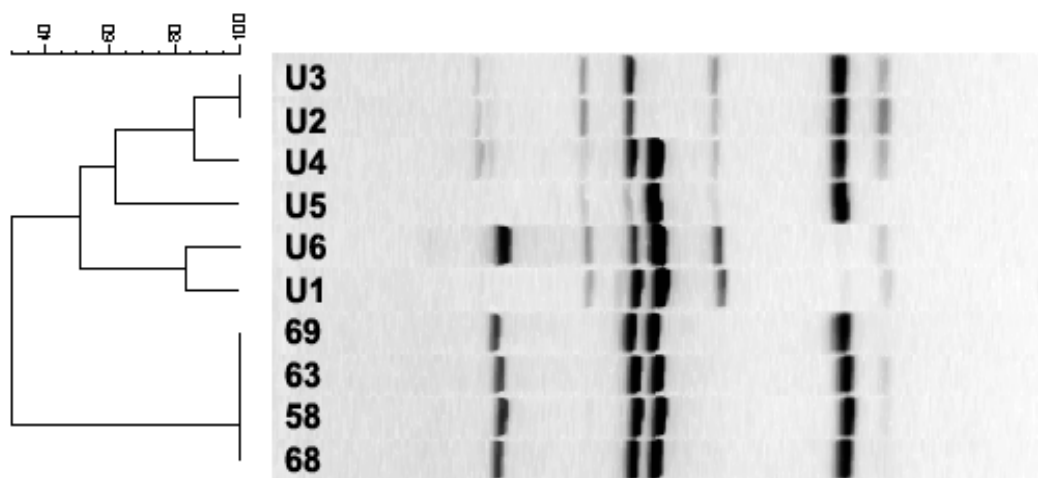
Při epidemiologických studiích je častým úkolem zjišťování vzájemné příbuznosti mezi izolovanými kmeny, proto byla schopnost McRAPD detekovat i genotypy některých druhů podnětem k využití možností daných předchozími poznatky k posouzení rozšířeného uplatnění McRAPD pro typizaci. Za tímto účelem byl uzpůsoben protokol McRAPD (viz kap. III. 2. 4. 2) pro účely kmenové typizace, úprava spočívala v použití méně vyhraněných podmínek – snížení teploty nasedání primeru na 40 °C a zvýšení koncentrace hořečnatých iontů na 2,5 mM.

Jako modelový soubor sloužily izoláty pocházející od dětského pacienta, u kterého se vyskytla nozokomiální infekce mozkomíšního moku (CSF) způsobená *C. lusitaniae*. Dítě bylo léčeno pro astrocytom mozku, následný obstrukční hydrocefalus vyžadoval zavedení ventrikuloperitoneálního zkratu (VPS). VPS byl velmi pravděpodobně zdrojem infekce, histologické vyšetření mozkové tkáně totiž neprokázalo známky mykózy. Izoláty *C. lusitaniae* byly opakovaně získány v průběhu dvou měsíců (16. 12. 1999 – 25. 2. 2000) z odběrů CSF a VPS ventilu. Tyto izoláty vykazovaly atypické vlastnosti, např. při asimilaci některých cukrů, což komplikovalo konvenční diagnostiku.

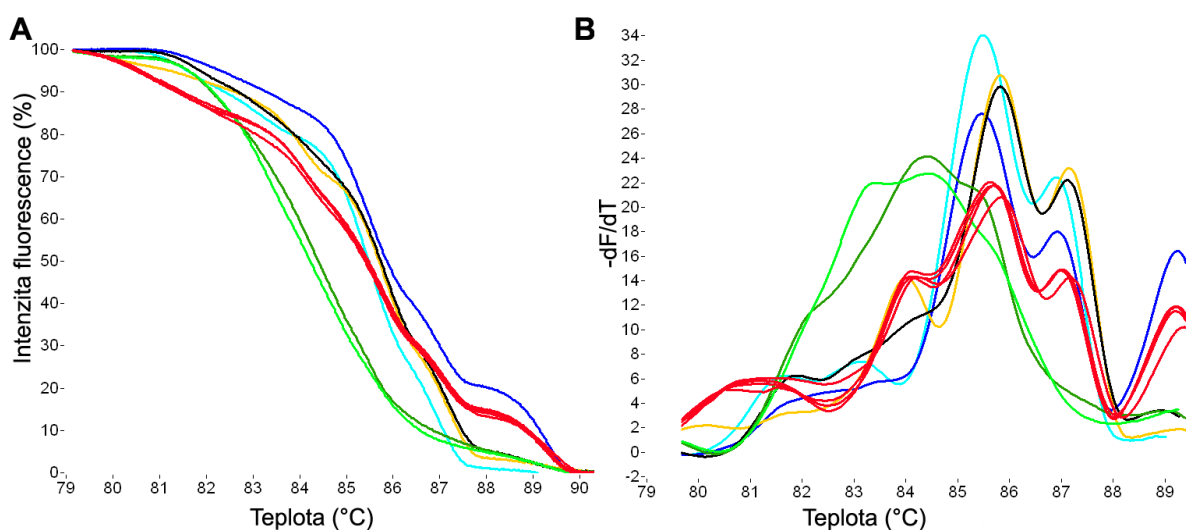
Molekulárně-genetická analýza izolátů spočívala ve srovnání dvou přístupů. Nejprve byla identita izolátů posuzována typizací pomocí PFGE, identický profil byl zjištěn u pěti izolátů, dva izoláty vykazovaly drobné odlišnosti v karyotypu – u izolátu č. 68 byl zjištěn malý posun v poloze pruhu velkého chromozomu a u izolátu č. 58 chyběl jeden malý chromozom a jeden velký byl navíc (výsledky poskytl Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.).

Pro potvrzení identity izolátů byla dále provedena McRAPD typizace se dvěma izoláty se společným karyotypem (č. 63 a č. 69) a s oběma izoláty, u kterých se projevil odchylky v karyotypu (č. 58 a č. 68). Do srovnání bylo také zahrnuto šest dalších nepříbuzných kmenů *C. lusitaniae* označených U1–U6 (U = unrelated). Mezi RAPD fingerprinty (Obr. 19) a profily tání (Obr. 20) izolátů č. 58, 63, 68 a 69 nebyl prokázán významný rozdíl (více než 95% shoda). Všechny křivky tání izolátů studovaného pacienta se rovněž shodovaly v poloze přítomných píků (Tab. 7). Při srovnání výsledků s nepříbuznými izoláty U1–U6 numerickou analýzou podobnosti McRAPD dat (Obr. 21) byla dokumentována velmi blízká příbuznost a pravděpodobná příslušnost izolátů ke stejnému kmeni. Drobné změny v karyotypu v jednom nebo dvou pruzích u série izolátů tohoto pacienta, které byly zjištěny pomocí PFGE, mohou tedy naznačovat proces mikroevoluce pravděpodobně v důsledku chromozomální translokace. Numerická analýza McRAPD dat byla mnohem rychlejší a jednodušší ve srovnání s PFGE i s tradičním RAPD fingerprintingem, ale nedokázala v tomto případě tak přesně postihnout drobné odchylky

mezi izoláty, jejichž podkladem jsou zřejmě reorganizace chromozomů v průběhu mikroevoluce kmene. Tato nižší rozlišovací schopnost RAPD a tedy i McRAPD může ale být při epidemiologické analýze i výhodou, protože při empirickém srovnávání PFGE karyotypů se experimentátor často potýká právě s problémem jak stanovit míru odlišnosti karyotypu zakládající již překročení hranice vnitrokmenných odchylek. Výsledky jsou shrnuty v článku „Hamal, P., et al.: Biofilm-positive *C. lusitaniae* strain caused infection of the ventriculo-peritoneal shunt in a cancer patient: usefulness of McRAPD for both species and strain typing“, který byl odeslán k publikaci v časopise *Mycoses* a je nyní v recenzním řízení.



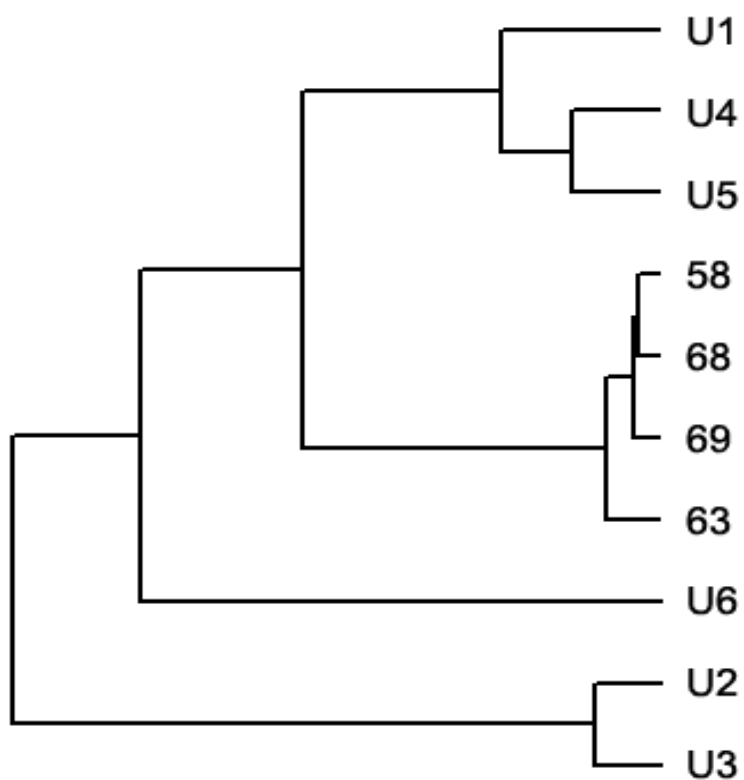
Obr. 19 – Dendrogram RAPD fingerprintů souboru izolátů *C. lusitaniae* (č. 58, 63, 68 a 69) a nepříbuzných kmenů U1–U6 sestavený programem GelCompare II metodou UPGMA s koeficienty vypočtenými dle Jaccarda s 1% tolerancí v poloze pruhů



Obr. 20 – Profily McRAPD jednotlivých izolátů *C. lusitaniae*. Normalizované (A) a derivované (B) křivky tání izolátů *C. lusitaniae* od studovaného pacienta jsou zobrazeny červeně, ostatními barvami jsou znázorněny křivky nepříbuzných izolátů U1–U6.

Tabulka 7 – Souhrn teplot tání píků souboru izolátů *C. lusitaniae* získaný při McRAPD typizaci

Číslo izolátu	Teplota tání ( °C)				
<b>58</b>	<b>81,5</b>	<b>84,1</b>	<b>85,7</b>	<b>87,0</b>	<b>89,3</b>
<b>63</b>	<b>81,4</b>	<b>84,2</b>	<b>85,9</b>	<b>87,2</b>	<b>89,4</b>
<b>68</b>	<b>81,2</b>	<b>84,2</b>	<b>85,7</b>	<b>87,0</b>	<b>89,2</b>
<b>69</b>	<b>81,1</b>	<b>84,1</b>	<b>85,6</b>	<b>87,0</b>	<b>89,2</b>
U1	81,7	83,1	85,5	86,9	
U2	83,4	84,5			
U3	84,4				
U4	82,0	85,8	87,1		
U5	84,0	85,8	87,1		
U6	85,5	86,9	89,3		



Obr. 21 – Kladogram vytvořený z McRAPD dat souboru izolátů *C. lusitaniae* (č. 58, 63, 68 a 69) a nepřibuzných kmenů U1–U6 na základě numerického vyjádření podobnosti normalizovaných křivek

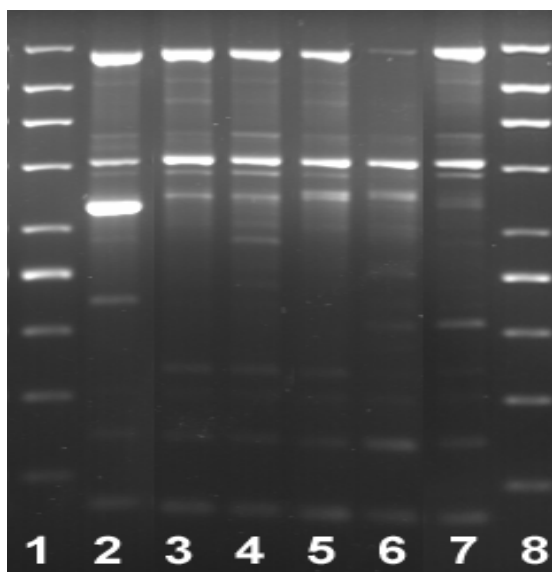
#### IV. 8 Typizace izolátů *C. albicans* k potvrzení kmenové identity

Metoda McRAPD byla také vyzkoušena pro typizaci izolátů *C. albicans*, které byly postupně odebírány v průběhu dvou let (28. 1. 2000 – 23. 2. 2002) od pacienta s VATER syndromem (z angl. Vertebrae, Anus, Trachea, Esophagus, and Renal abnormalities). Celkem bylo získáno 39 izolátů *C. albicans* převážně z moče a močového katetru, několik pocházelo z hnisu a stolice (viz příloha H).

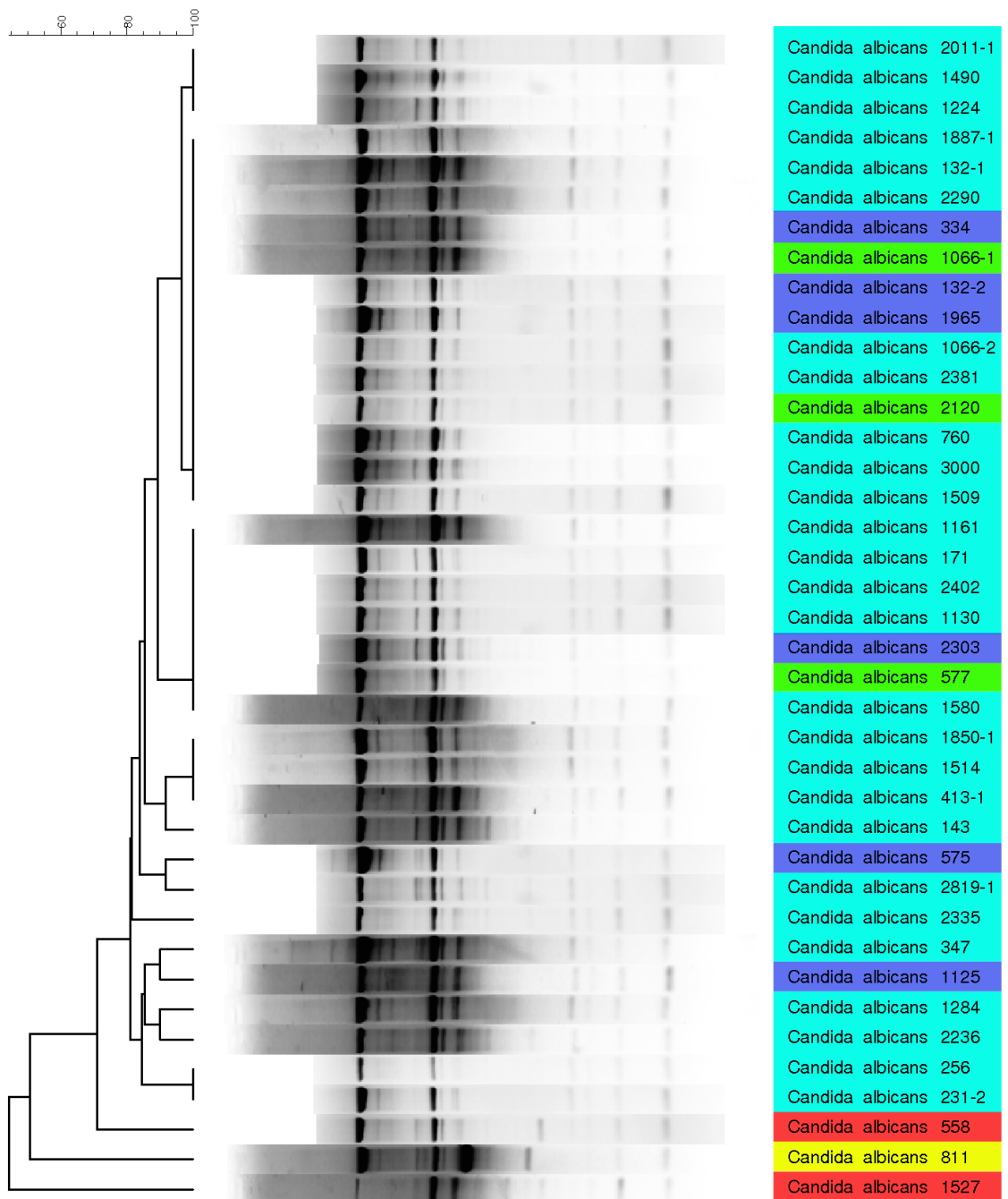
Typizace těchto izolátů byla prováděna nejprve pulzní elektroforézou, kterou byly klasifikovány podle karyotypů do skupin označených A až E (výsledky karyotypizace poskytnul Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D. a jsou uvedeny v příloze I). Většina izolátů byla zařazena do skupin A, B nebo C a pocházely z moči nebo močového katetru. Jako nejodlišnější se jevil izolát č. 811, který pocházel ze stolice a byl jako jediný zařazen do skupiny E, a dále dva izoláty s karyotypem D – č. 1527 (stolice) a č. 558 (hnis).

Pro účely kmenové typizace metodou McRAPD byl použit protokol uvedený v kapitole III. 2. 4. 2, stringence reakce byla snížena zvýšením koncentrace hořčíku na 2,5 mM a snížením teploty nasedání primeru na 40 °C.

RAPD fingerprinty většiny izolátů obsahovaly pruhy shodné velikosti a podobné intenzity, pouze izolát č. 811 měl navíc silný pruh o velikosti cca 700 bp, izolát č. 558 měl navíc slabý pruh o velikosti cca 400 bp a izolát č. 1527 měl pruh o velikosti cca 1500 bp oproti ostatním izolátům velmi slabý a navíc slabý pruh o velikosti cca 400 bp (obr. 22). Tyto kmeny byly v dendrogramu zpracovaném na základě fingerprintů odděleny od shluku izolátů s karyotypem A, B a C, jak je zřejmé z obrázku 23.



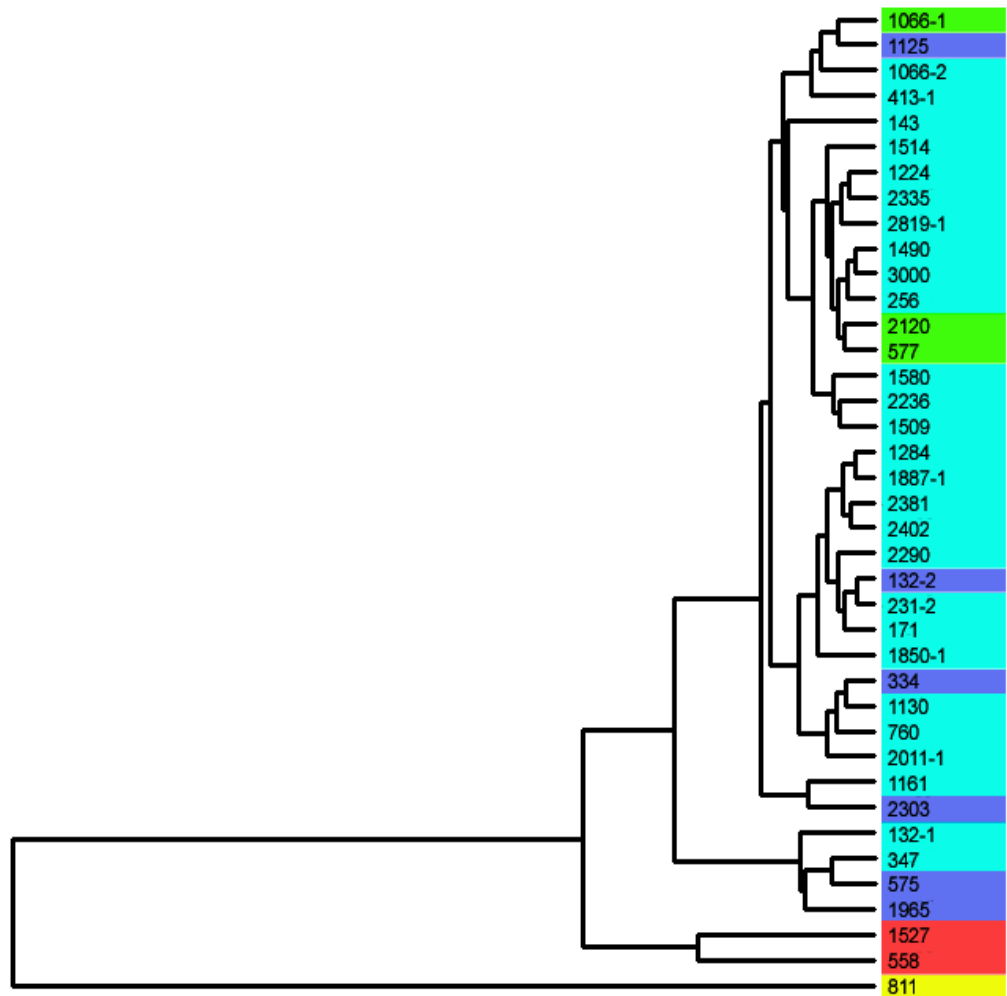
Obr. 22 – Elektroforeticky rozdělené produkty RAPD vybraných izolátů *C. albicans*. Dráhy: 1 a 8 - DNA marker 200–1500 bp, dráha 2 - izolát č. 811, dráha 3 - izolát karyotypu C, dráha 4 - izolát karyotypu A, dráha 5 - izolát karyotypu B, dráha 6 - izolát č. 1527, dráha 7 - izolát č. 558



Obr. 23 – Dendrogram fingerprintů všech izolátů *C. albicans* sestavený programem GelCompare II metodou UPGMA s koeficienty vypočtenými dle Jaccarda s 1% tolerancí v poloze pruhů. Barevné podkreslení: **tyrkysová** - izoláty s karyotypem A, **zelená** - izoláty s karyotypem B, **modrá** - izoláty s karyotypem C, **červená** - izoláty s karyotypem D, **žlutá** - izolát s karyotypem E.

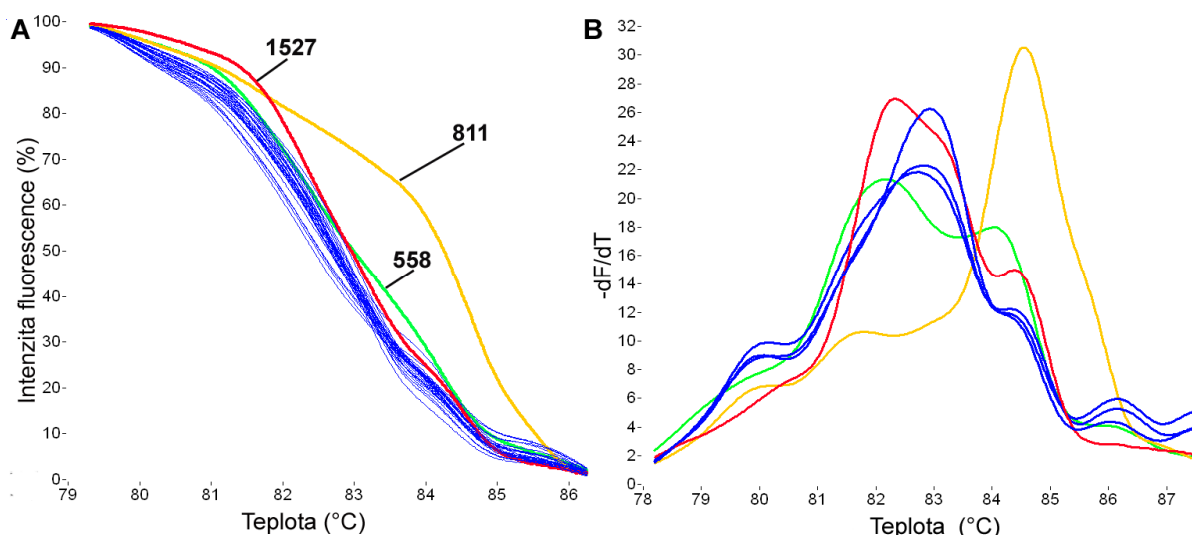
Podobnost křivek táni produktů RAPD byla vyhodnocena numericky a na základě matice koeficientů podobnosti byl metodou UPGMA zkonstruován dendrogram, který je uveden na obrázku 24.





Obr. 24 – Dendrogram sestavený programem PhyloDraw na základě numerické podobnosti křivek tání při McRAPD typizaci všech izolátů *C. albicans*. Barevné podkreslení: tyrkysová - izoláty s karyotypem A, zelená - izoláty s karyotypem B, modrá - izoláty s karyotypem C, červená - izoláty s karyotypem D, žlutá - izolát s karyotypem E.

Z tohoto dendrogramu vyplývá, že zatímco izoláty s karyotypem A, B a C McRAPD analýza nebyla schopná rozlišit, izoláty s karyotypem D a E vyhodnotila jako odlišné. Tvar křivek je možné postihnout pomocí derivace křivek tání (Obr. 25) a porovnání pík odpovídajících teplotě tání. U všech izolátů s karyotypem A, B a C byly přítomny píky odpovídající teplotě tání  $82,63 \pm 0,43$  °C,  $86,12 \pm 0,36$  °C a  $87,56 \pm 0,17$  °C, v 97 % případů také pík  $84,36 \pm 0,15$  °C a v 86 % případů také pík  $80,01 \pm 0,22$  °C. U izolátů karyotypu D a E tyto píky buď chyběly, nebo se objevily píky mimo daná rozmezí (ty jsou v tab. 8 zvýrazněny tučným písmem).



Obr. 25 – Normalizované křivky tání (A) a odpovídající derivované křivky tání (B) amplifikačních produktů McRAPD souboru izolátů *C. albicans*. **Žlutě** je vyznačena křivka náležící izolátu č. 811, **červeně** křivka náležící izolátu č. 1527 a **zeleně** křivka náležící izolátu č. 558, **modrou** barvou jsou zvýrazněny křivky izolátů s karyotypem A, B a C. V grafu derivovaných křivek tání je pro udržení přehlednosti vynesena vždy jen jedna reprezentativní křivka izolátů příslušných ke karyotypu A, B nebo C.

**Tabulka 8 - Souhrn teplot tání píků souboru izolátů *C. albicans* získaný při McRAPD typizaci**

karyotyp	$T_m \pm 2SD$ ( °C)				
A-C	80,01±0,22	82,63±0,43	84,36±0,15	86,12±0,36	87,56±0,17
D (izolát 558)		82,3	<b>84,1</b>	85,84	
D (izolát 1527)		82,3	84,5		
E (izolát 811)	80,1	<b>81,8</b>	<b>84,6</b>		

Dle výše uvedených výsledků se lze domnívat, že izolát č. 811 je pravděpodobně geneticky nepříbuzný kmen, zatímco v případě izolátů č. 1527 a č. 558 by mohlo jít o geneticky příbuzné kmeny, které prošly mikroevolucí v důsledku kolonizace odlišného místa v těle pacienta. Ve srovnání s metodou PFGE, která při typizaci těchto izolátů byla schopná rozlišit pět skupin izolátů podle karyotypu, typizace pomocí McRAPD opět vykazovala nižší rozlišovací schopnost, přičemž izoláty skupin A, B a C nebyla schopná od sebe odlišit. Platí ale obdobný závěr jako u typizace *C. lusitaniae* (viz kap. IV. 7), který je v tomto případě ještě lépe dokumentován na větším souboru izolátů – nižší rozlišovací schopnost RAPD a tedy i McRAPD může ale být při epidemiologické analýze i výhodou, protože při empirickém srovnávání PFGE karyotypů se experimentátor často potýká právě

s problémem jak stanovit míru odlišnosti karyotypu zakládající již překročení hranice vnitrokmenových odchylek. V tomto modelovém případě tradiční RAPD i numericky vyhodnocená McRAPD správně identifikovala jako shodné izoláty, které z epidemiologického kontextu příslušejí velmi pravděpodobně ke stejnému kmeni, a přitom přesvědčivě odlišila jeden jednoznačně nepříbuzný izolát a u dvou dalších správně naznačila pravděpodobnou mikroevoluci.

## V. DISKUZE

Ke zhodnocení použitelnosti McRAPD pro identifikaci lékařsky významných kvasinek byl v této práci vybrán soubor izolátů devíti druhů kvasinek, které v našich podmínkách pokrývají téměř 95 % izolátů nejčastěji získávaných z klinických vzorků. Tento soubor zahrnoval 5 nejběžnějších druhů kandid (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* a *C. parapsilosis*), dále méně běžné druhy *C. lusitaniae* a *C. guilliermondii*, které ale patří mezi kvasinky vykazující nejčastěji rezistenci k amfotericinu B a flukonazolu při pokusech *in vitro* (Girmeria et al., 2006). Další do souboru zahrnutá *C. pelliculosa* má nízkou citlivost na antimykotika flukonazol, itraconazol a ketokonazol (Barchiesi et al., 1999). Do souboru byla také zařazena *S. cerevisiae*, protože i když jde o kvasinku primárně nepatogenní, je často izolována z trávicího traktu člověka a je proto žádoucí ji správně identifikovat a odlišit od jiných, lékařsky významnějších druhů kvasinek. Přesto existují infekce způsobené *S. cerevisiae*, které jsou klinicky nerozpoznatelné od invazivní kandidózy a objevují se stále častěji (Enache-Angoulvant et Hennequin, 2005).

Je potřeba zdůraznit, že vyhodnocování identifikační schopnosti McRAPD probíhalo pouze na omezeném a uměle vytvořeném souboru izolátů, ve kterém dominovaly kmeny získané v regionu Střední Moravy. V budoucnu by měla být získána velká a dobře ocharakterizovaná sada vzorků z různých geografických lokací, která by tvořila základ obsáhlé knihovny profilů kandid a dalších kvasinek, což by pomohlo zvýšit schopnost a přesnost zařazování neznámých vzorků. Překvapivě nejlepší výsledky z přístupů testovaných pro vyhodnocování McRAPD dat byly získány vizuálním srovnáváním derivovaných křivek tání, byly srovnatelné s klasickou RAPD identifikací. Dá se ovšem předpokládat, že s přibývajícím počtem izolátů bude vizuální identifikace stále pracnější, naproti tomu automatická identifikace na základě porovnání numerických dat by se měla nadále zpřesňovat. Oba přístupy by se pak mohly kombinovat. Pokud bude k dispozici rozsáhlá databáze výsledků analýzy tání, bude možné u automatizované identifikace definovat kritickou míru numerické podobnosti, která je u jednotlivých druhů zárukou správné identifikace. Pouze ty izoláty, které tomuto práhu nevyhoví, by mohly být podrobeny o něco pracnějšímu, ale přesnějšímu vizuálnímu porovnávání, které by jen potvrzovalo nebo korigovalo výsledky automatického zpracování dat. Protože ani vizuální porovnávání nemusí vždy přinést jednoznačný závěr, je výhodou metody i fakt, že výsledek amplifikace lze i poté podrobit gelové elektroforéze a získaný fingerprint standardně srovnat s databází fingerprintů různých druhů. Přesnost identifikace by se pravděpodobně dala zlepšit také rozšířením systému identifikace ještě pro další primer, kdy by se kombinovaly výsledky zjištěné z profilů téhož vzorku získané simultánně dvěma různými primery.

Výhodné je, že výsledky McRAPD identifikace se obdrží ve formě dendrogramu. I přes určitou nejistotu identifikace se dá totiž s velkou pravděpodobností očekávat, že neznámý izolát bude náležet k jednomu z druhů/genotypů ve společném klastru, kam byl automatickou identifikací zařazen. Je zřejmé, že automatická identifikace McRAPD, která je založena na porovnávání polohy křivek tání, dokáže velmi přesně odlišit druhy na vzdálenějších větvích dendrogramu, naproti tomu mnohem menší rozlišovací schopnost má v rámci druhů spadajících do jednoho klastru. Identifikaci by bylo možné provádět také mechanickým přiřazením neznámého vzorku ke druhu s nejvyšší hodnotou koeficientu podobnosti, ale promítnutí tohoto koeficientu podobnosti do struktury dendrogramu/kladogramu je výhodnější, protože umožňuje rychle vizuálně zhodnotit podobnost křivky tání vyšetřovaného izolátu s větším souborem a posoudit tak míru spolehlivosti přiřazení – pokud bude izolát jen nejvíce podobný určitému druhu, ale v dendrogramu se bude svým zařazením vymykat jednoznačné příslušnosti ke shluku kmenů tohoto druhu, lze mít o správnosti takové identifikace oprávněné pochybnosti.

Dobrym podpurným vodítkem pro správný závěr identifikace v rutinním provozu může být také použití ploten s izolačním a identifikačním chromogenním médiem CHROMagar, na které se klinické vzorky očkují. Ačkoliv CHROMagar pomáhá identifikovat s uspokojivou přesností běžné druhy kandid (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, případně *C. glabrata*), nemůže zcela nahradit standardní identifikační protokoly. Existují například pochybnosti o spolehlivosti identifikace *C. glabrata* na CHROMagaru, zvláště pro méně zkušené vyhodnocovatele, protože tvoří narůžovělé kolonie hůře odlišitelné od vzácnějších druhů (*C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *S. cerevisiae*, apod.) (Willinger et Manafi, 1999). Předběžná identifikace na CHROMagaru ale pomůže zúžit výběr možných druhů pro následnou identifikaci McRAPD. Pokud například existuje podezření, že izolát je buď *C. glabrata* nebo *S. cerevisiae*, a ostatní druhy lze na základě vzhledu a barvy kolonií na CHROMagaru spolehlivě vyloučit, zahrnou se do automatické identifikace McRAPD jen tyto druhy. V příloze J je uveden příklad takové kombinované identifikace, kdy byly pouze dva izoláty *C. glabrata* z daného souboru určeny chybně jako *S. cerevisiae* a míra správné identifikace dosáhla 95 % ve srovnání s pouze 58,5% správností identifikace *C. glabrata* při použití pouze numerické automatické identifikace.

Vzhledem k tomu, že při použití metody RAPD dochází k amplifikaci jakékoliv DNA ve vzorku, je nutné získat DNA až ze subkultivovaných klinických izolátů. Tato zdánlivá nevýhoda může být vyvážena jinými výhodami. Postup obchází častý problém těch metod mikrobiální molekulárně-genetické diagnostiky, které jsou založeny na izolaci DNA patogenu přímo z krve. V řadě případů totiž získáme falešně negativní výsledek kvůli inhibici PCR složkami krve nebo nadbytkem lidské DNA oproti fungální DNA přítomné v krvi, nebo naopak falešně pozitivní výsledek třeba v případě namnožení „DNA pozadí“ (viz

kap. I. 6. 2. 2. 1. 5). Nezanedbatelný je i ekonomický aspekt, protože McRAPD analýza by mohla být prováděna jen u pozitivně kultivovaných vzorků. Postup sice vede k prodloužení celkové doby identifikace, ale ta je stále výrazně kratší v porovnání s tradiční identifikací a zároveň je zachována možnost paralelní charakterizace patogenu, např. stanovení citlivosti k antimykotikům. Kultivační metody doposud v mikrobiální diagnostice jasně převažují a ani v blízké budoucnosti se nepředpokládá, že by nekultivační metody kultivaci zcela vytlačily, spíše ji budou doplňovat. Nekultivační metody se v současné době využívají stále převážně jen pilotně a to především k detekci infekcí u vybraných skupin vysoce rizikových pacientů. Naproti tomu kultivační metody se využívají u všech ostatních pacientů a také k monitorování kolonizace sliznic kvasinkami rovněž u vysoce rizikových pacientů (především příjemci HSC u hematologických malignit). Tento typ monitoringu slouží ke včasnému varování před možností vývoje infekce, kterému kolonizace předchází, a také k lepšímu nasměrování antifungální profylaxe na základě druhové identifikace. Právě u těchto pacientů může být McRAPD identifikace čisté kultury významným přínosem, protože může za ekonomicky výhodných podmínek zkrátit dobu získání výsledku ze 4–10 dnů (2 dny kultivace + 2–8 dní identifikace konvenčními fenotypovými postupy) na 2–3 dny (2 dny kultivace + McRAPD tentýž nebo následující den).

V otázce budoucího přínosu McRAPD se musí brát v potaz výhody a nevýhody samotné metody RAPD, která je základem McRAPD. Ta bývá často zavrhována pro náchylnost k nestálosti výsledků v důsledku drobných změn v reakčních podmínkách, což snižuje především mezilaboratorní reprodukovatelnost (Penner et al., 1993; Meunier et Grimont, 1993). Protože McRAPD nemá přednostně sloužit ke kmenové typizaci, ale k druhové identifikaci, snahou bylo uzpůsobit reakční podmínky tak, aby bylo dosaženo minimální mezikmenové variability výsledků a tím snížení citlivosti výsledků reakce k výkyvům reakčních podmínek na minimum. Na mezilaboratorní reprodukovatelnost může mít vliv použití jiného modelu termocykleru nebo *Taq* polymerázy od jiného výrobce. Nová generace termocyklerů však řídí teplotu vzorku v kapiláře pomocí proudícího vzduchu velmi přesně a existují celosvětově komerčně dostupné kvalitní *Taq* polymerázy, takže riziko ovlivnění výsledku je minimální a zanedbatelné ve srovnání s přínosem McRAPD v oblasti druhové identifikace. Také se nabízí řešení v podobě vývoje jednotné komerčně připravené soupravy komponentů pro McRAPD.

Ve srovnání s dalšími genotypizačními metodami je RAPD velmi nenáročná, rychlá a ekonomicky výhodná. Užitečnost této metody pro identifikaci kvasinek byla opakovaně vyzdvižena nezávisle několika týmy (Lehmann et al., 1992; Thanos et al., 1996; Liu et al., 1996; Steffan et al., 1997; Melo et al., 1998; Bautista-Munoz et al., 2003). Pokud má laboratoř k dispozici techniku HRMA, pak je McRAPD analýza ještě pohodlnější a rychlejší, protože odpadá provádění gelové elektroforézy a těžkopádná analýza rozložení pruhů.

Vynechání elektroforézy ovšem znamená nemožnost vizuální kontroly fingerprintu na gelu. Spolehlivost výsledků McRAPD pak může být diskutabilní vzhledem k tomu, že nespecifická PCR má potenciál namnožit i kontaminují DNA. Rovněž selhání extrakce DNA může být zdrojem neadekvátních výsledků McRAPD, způsobených nedostatkem kvalitní DNA pro amplifikaci. Tyto chyby lze ale ošetřit sledováním prahu fluorescence amplikonů, v obou výše zmíněných případech selhání McRAPD nedosáhne fluorescence kritické hodnoty počáteční fluorescence (viz kap. IV. 3. 2). Pokud se využívá real-time termocykler, lze kontrolovat také dynamiku nárůstu fluorescence během amplifikace, kdy vzestup fluorescence až v pozdějších cyklech odhaluje nesprávný průběh.

Protože genotypizační techniky ještě nejsou ve většině mikrobiologických laboratoří zavedeny, v rutinní identifikaci kvasinek stále dominují konvenční fenotypizační *in-house* techniky. Výsledek McRAPD identifikace se obdrží 3,5 hodiny poté, co se subkultivací získá kolonie minimální velikosti, zatímco konvenční metody vyžadují k vyhodnocení 2–8 dní. Podle výsledků této práce McRAPD identifikuje kvasinky srovnatelně nebo přesněji než tyto tradiční techniky. Z 16 sporných izolátů, u kterých nesouhlasila tradiční a McRAPD identifikace a byly tedy dodatečně identifikovány také pomocí komerční soupravy ID 32C, bylo 9 izolátů nesprávně určeno tradičními metodami, navíc 4 izoláty *C. metapsilosis* nedokázala oproti McRAPD správně identifikovat ani souprava ID 32C. Tři izoláty, u kterých pomocí McRAPD nebylo možné navrhnout žádnou alternativní identifikaci, určila lépe ID 32C. Je možné, že se jednalo o zástupce reprezentující určitý genotyp, který byl v daném souboru izolátů zastoupen v jediném exempláři. Pokud McRAPD nedokáže izolát určit, stále existuje možnost tentýž vzorek dodatečně podrobit elektroforéze a přiřadit jej podle fingerprintu. Jak je zřejmé z dendrogramu RAPD fingerprintů všech izolátů ze zkoumaného souboru (příloha D), RAPD dokázala identifikovat 2 z 3 izolátů, které nebylo podle profilu tání možné zařadit.

Za standard fenotypizačních technik bývá považován asimilační kit 32 cukrů ID 32C. Podobně jako kterákoli jiná identifikační metoda, ani ID 32C nedosahuje absolutní přesnosti (Koehler et al., 1999) a v identifikačních databázích některé vzácnější druhy kvasinek nejsou vůbec zahrnuty. Protože je princip metody založen na asimilaci cukrů, nedokáže odlišit některé blízce příbuzné druhy (např. *C. metapsilosis* od *C. parapsilosis*), jiné jsou zařazeny do identifikačního klíče až nějakou dobu po objevení, kdy je otestován dostatečně velký soubor kmenů a zjištěna spolehlivá fenotypová charakteristika, do té doby je nově popsaný druh identifikován nesprávně (např. *C. dubliniensis* versus *C. albicans*). V takové situaci má McRAPD výhodu v tom, že při detekci dosud neznámého nebo nedostatečně diferencovaného druhu s velkou pravděpodobností zobrazí odlišnou křivku, která bude obtížně zařaditelná a dá tak podnět k ověření výsledku nejlépe sekvenováním genu pro rRNA. Genotypizační techniky s vysokým rozlišením, ke kterým McRAPD patří, navíc

rozlišují i různé genotypy. Typizaci uvnitř druhu lze pak s výhodou využít k vyhledávání genotypů, které mohou být spojeny s určitou klinicky významnou vlastností (faktory virulence, citlivost k antimykotikům). Na druhou stranu odhalování a odlišování dosud necharakterizovaných genotypů ztěžuje přiřazování izolátů ke konkrétnímu druhu, a pokud srovnávací databáze není dostatečně obsáhlá, vede k nesprávné nebo neukončené identifikaci některých vzorků. To může být zpočátku překážkou globální použitelnosti McRAPD. Co se týká časové náročnosti metod, výsledek McRAPD lze získat 3,5 hodiny po nárůstu kolonií minimální velikosti, zatímco spolehlivý výsledek ID 32C lze dle výrobce získat po 24–48 hodinách kultivace primárně izolované kvasinky. Zkušenosti rutinní mykologické laboratoře Ústavu mikrobiologie LF UP Olomouc navíc ukazují, že u mnoha druhů je výsledek identifikace po 24 hod. nespolehlivý, proto jsou identifikace pomocí ID 32C vždy uzavírány nejdříve po 48 hod., u některých izolátů je nutné inkubaci prodloužit až na 72 hod. Naproti tomu jestliže je nespolehlivý nebo nejednoznačný výsledek McRAPD, lze jej zkontrolovat elektroforézou nebo ihned zopakovat, kdežto opakování ID 32C vyžaduje nejméně další dva dny kultivace. Výraznější překážkou zavedení metody McRAPD by se mohlo stát pořízení nákladného zařízení, ID 32C lze totiž provádět v jakékoli kultivační laboratoři bez speciálního vybavení. Ceny real-time termocyklierů s HRMA technologií s rostoucí konkurencí na trhu však nadále klesají a laboratoře tyto moderní přístroje mohou vytižit řadou dalších genetických vyšetření a rozložit tak pořizovací náklady.

Protože během testování použitelnosti McRAPD identifikace byly na základě průběhu křivek detekovány i rozdílné genotypy některých druhů, nabízelo se mírně modifikovat protokol také pro účely ověřování genetické příbuznosti izolátů přiřazených již dříve k určitému druhu. Výsledky byly srovnávány s karyotypizací stejného souboru izolátů, protože bývá považována za zlatý standard v typizaci řady kvasinek. Při pilotní vnitrodruhové typizaci izolátů *C. lusitaniae* pacienta s nádorem mozku nebyly pomocí McRAPD zjištěny rozdíly mezi testovanými izoláty, což potvrzuje jejich příslušnost ke stejnému kmeni, zatímco pomocí PFGE byly zjištěny drobné odchylky v karyotypu dvou izolátů. PFGE patří k velmi citlivým typizačním systémům s vysokou rozlišovací schopností, které často odhalí rozdíly i mezi izoláty téhož kmene. Obecně se kmeny, které se liší v počtu a/nebo pozici jednoho nebo dvou chromozomů v PFGE karyotypu, nedají považovat za rozdílné. Podle dříve publikovaných epidemiologických studií je navíc nepravděpodobné, že by opakovaně odebrané izoláty *C. lusitaniae* od jednoho pacienta pocházely z rozdílných kmenů (McClenny et al., 2002). Z výše uvedeného se dá usuzovat, že se u testovaných izolátů *C. lusitaniae* opravdu jednalo o izoláty stejného kmene, přičemž mírné odchylky PFGE karyotypu dvou izolátů lze vysvětlit mikroevoluční změnou možnou i v důsledku terapie antimykotiky. Sledované období bylo příliš krátké na to, aby během něho



došlo k reinfekci pacienta dvěma kmeny stejného druhu kvasinky, která náleží spíše k těm vzácnějším.

Další soubor použitý k ověření typizačních schopností McRAPD tvořily izoláty *C. albicans* získané z různých míst těla během dvouleté hospitalizace pacienta s VATER syndromem, které byly rozděleny podle karyotypu do pěti skupin označených A až E. Genom *C. albicans* je vysoce dynamický, v důsledku vysokého stupně numerických i strukturálních chromozomálních reorganizací byly v literatuře popsány u kmenů této kvasinky velmi variabilní karyotypy (Magee et Magee, 1987; Merz, 1990; Rustchenko-Bulgac, 1991). Proto drobné rozdíly zjištěné mezi karyotypy sledovaných izolátů nejspíše odráží proces mikroevoluce u stejného kmene v průběhu času a kolonizace odlišných míst v těle. McRAPD typizací nebyly mezi izoláty s karyotypem A, B a C zjištěny žádné rozdíly a izoláty s karyotypem D vykazovaly jen mírnější odchylky v průběhu křivek tání. Jednoznačně se odlišoval pouze izolát s karyotypem E, který na základě jiného průběhu normalizované i derivované křivky tání lze považovat za zástupce nepříbuzného kmene *C. albicans*.

Nevýhodou karyotypizace je, že vyžaduje speciální vybavení, 2 až 4 dny na provedení a současně lze zpracovat jen omezený počet vzorků. Oproti tomu McRAPD je méně pracná a tedy více vhodná pro rutinní analýzy. Pro dosažení optimálního výsledku typizace je vhodné kombinovat více nezávislých genetických technik, protože typizace téhož kmene pomocí různých markerů vede někdy k různým výsledkům. Vzhledem k tomu, že interpretace výsledků karyotypizace není triviální, zejména v kontextu určitých pochybností o stabilitě karyotypu, mohla by ji McRAPD jako metoda rychlé typizace vhodně doplnit nebo při rychlé prvotní epidemiologické analýze, příp. při průběžné surveillance, i nahradit. Odráží totiž pravděpodobně lépe celkovou míru variability genetické informace, procesy při reorganizaci genomu na tvorbu produktů RAPD většinou nemají vliv, v určitých situacích tedy lze z analýzy vyvodit jednoznačnější závěry.

Závěrem lze konstatovat, že McRAPD se jeví jako velmi perspektivní metoda rutinní identifikace lékařsky významných kvasinek. Nejednoznačný výsledek automatizované McRAPD identifikace nebo výsledek nesplňující kritérium spolehlivosti lze ověřit nebo zpřesnit vizuálním hodnocením profilů tání, příp. elektroforézou produktů. U sporných izolátů lze McRAPD dle možností laboratoře doplnit tradičními technikami či přímým sekvenováním. McRAPD má také potenciál odhalovat nové klinicky významné genotypy kvasinek, jak je ukázáno u *C. tropicalis* v kapitole IV. 5. Spojením karyotypizace a McRAPD vzniká efektivní typizační přístup, v budoucnu by těmito metodám mohla konkurovat jen metoda MLST, která dosud není obecně přístupná a zavedená.

## VI. ZÁVĚRY

1. Protokol McRAPD analýzy byl upraven pro použití na termocykleru RapidCycler 2 (Idaho Technology, USA) a na přístroji pro analýzu teplot tání s vysokým rozlišením High Resolution Melter HR-1 (Idaho Technology, USA). Pro dosažení lepší reprodukovatelnosti výsledků a co nejnižší vnitrodruhové variability pro účely druhové identifikace byla empiricky optimalizována vyhraněnost reakčních podmínek.
2. Bylo prokázáno, že příprava hrubého lyzátu mikrokolonií kvasinek je vhodnou rychlou a ekonomickou metodou získávání templátové DNA pro účely McRAPD. Tato technika je spolehlivá, pokud ji provádí zkušený pracovník.
3. Bylo prokázáno, že intralaboratorní variabilita výsledků v rámci jednoho experimentu i mezi experimenty McRAPD je velmi nízká.
4. Bylo prokázáno, že McRAPD identifikuje kvasinky přesněji než tradiční techniky, založené na posouzení mikromorfologie a asimilaci a fermentaci omezeného spektra substrátů, a srovnatelně s komerční soupravou asimilačních testů ID 32C.
5. Z testovaných identifikačních algoritmů pro interpretaci McRAPD dat vybraného souboru izolátů vykazoval nejpřesnější výsledky algoritmus identifikace na základě vizuálního hodnocení podobnosti derivovaných křivek, který se téměř vyrovnal přesnosti identifikace tradičního RAPD fingerprintingu.
6. McRAPD umožnilo u některých druhů patogenních kvasinek rozlišení genotypů s rozdílnými klinicky významnými vlastnostmi.
7. Vnitrodruhová typizace pomocí automatizované McRAPD poskytovala u modelových souborů izolátů *C. lusitaniae* a *C. albicans* jednoznačnější výsledky než karyotypizace. Karyotypizace sice vykazovala vyšší rozlišovací schopnost, ale její interpretace může být vzhledem k nestabilitě genomu kandid problematická.
8. Protože automatizovaná metoda McRAPD nevyžaduje na rozdíl od RAPD provedení a hodnocení gelové elektroforézy ani neklade speciální požadavky na odbornost obsluhy, má potenciál jako rychlá, ekonomická a nenáročná metoda významně přispět k doplnění a zkvalitnění identifikace a typizace klinických izolátů kvasinek v rutinních diagnostických laboratořích.

## VII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AANENSEN, D. M. – SPRATT, B. G. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* [online], 2005, roč. 33, s. W728-W733. Dostupné z <<http://www.nar.oxfordjournals.org>>.
- ALEXANDER, B. D., et al. Cost savings with implementation of PNA FISH testing for identification of *Candida albicans* in blood cultures. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2006, roč. 54, s. 277-282.
- ANAISSE, E. J., et al. Management of invasive candidal infections: result of a prospective, randomized, multicenter study of fluconazole versus amphotericin B and review of literature. *Clin. Infect. Dis.*, 1996, roč. 23, s. 964-972.
- ANDERSON, J., et al. Characterization and partial nucleotide sequence of the DNA fingerprinting probe Ca3 of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, roč. 31, s. 1472-1480.
- BAILLIE, G. S. – DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1999, roč. 46, s. 397-403.
- BALL, L. M., et al. Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogenic stem cell transplantation. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, roč. 42, s. 1673-1679.
- BARCHIESI, F., et al. Genotypic identification of sequential *Candida albicans* isolates from AIDS patients by polymerase chain reaction techniques. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1997, roč. 16, s. 601-605.
- BAUTISTA-MUNOZ, C., et al. Identification of *Candida* spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, roč. 41, s. 414-420.
- BERENQUER, J., et al. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1993, roč. 17, s. 103-109.
- BHALLY, H. S., et al. Infection in a neonate caused by *Pichia fabianii*: Importance of molecular identification. *Med. Mycol.*, 2006, roč. 44, s. 185-187.

- BLUMBERG, E. A. – REBOLI, A. C. Failure of systemic empirical treatment with amphotericin B to prevent candidemia in neutropenic patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.*, 1996, roč. 22, s. 462-466.
- BOCCIA, S., et al. Genotypic analysis by 27A DNA fingerprinting of *Candida albicans* strains isolated during an outbreak in a neonatal intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 2002, roč. 23, s. 281-284.
- BODROSSY, L. – SESSITSCH, A. Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2004, roč. 7, s. 245-254.
- BONASSOLI, L. A. – BERTOLI, M. – SVIDZINSKI, T. I. E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J. Hosp. Infect.*, 2005, roč. 59, s. 159-162.
- BORST, A., et al. Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, roč. 41, s. 1357-1362.
- BOTTEREL, F., et al. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, roč. 39, s. 4076-4081.
- BOUGNOUX, M. E., et al. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, roč. 37, s. 925-930.
- BOUGNOUX, M. E. – MORAND, S. – d'ENFERT, C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, roč. 40, s. 1290-1297.
- BU, R., et al. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J. Med. Microbiol.*, 2005, roč. 54, s. 243-248.
- BUCHAILLE, L., et al. Evaluation of six commercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1998, roč. 17, s. 479-488.
- BUCHMAN, T. G., et al. Detection of surgical pathogens by *in vitro* DNA amplifications. Part 1. Rapid identification of *Candida albicans* by *in vitro* amplification of a fungus-specific gene. *Surgery*, 1990, roč. 108, s. 338-347.
- BURGENER-KAIRUZ, P., et al. Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-alpha-demethylase (L1A1) gene fragment. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, roč. 32, s. 1902-1907.

- CALDERONE, R. A. (ed.). *Candida and candidiasis*. 2002. Washington D.C.: ASM Press. 451 s.
- CARLILE, M. J. – WATKINSON, S. C. – GOODAY, G. W. *The fungi*. 2nd edition, 2001. St. Louis (Missouri): Academic Press. 588 s.
- COIGNARD, C. Resolution of discrepant results for *Candida* species identification by using DNA probes. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, roč. 42, s. 858-861.
- COLEMAN, D., et al. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected patients. *Oral Dis.*, 1997, roč. 3, s. 96-101.
- COLLAZOS, J. – MAYO, O. J. – MARTINEZ, E. Changing spectrum of HIV infection and its associated conditions in Spain: the end of the beginning? *AIDS Patient Care STDS*, 1999, roč. 13, s. 347-353.
- COMPTON, J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 1991, roč. 350, s. 91-92.
- CRAMPIN, A. C. – MATTHEWS, R. C. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment. *J. Med. Microbiol.*, 1993, roč. 39, s. 233-238.
- DENDIS, M., et al. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2003, roč. 9, s. 1191-1202.
- DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*, 2003, roč. 362, s. 1142-1151.
- DESNOS-OLLIVIER, M., et al. Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008, roč. 14, s. 557-565.
- DIGNANI, M. C. – SOLOMKIN, J. – ANAISSIE, E. J. *Candida*. In: ANAISSIE, E. J. – MCGINNIS, M. R. – PFALLER, M. A. (eds.). *Clinical mycology*. 2003. Philadelphia: Churchill Livingstone. 768 s.
- DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.*, 2003, roč. 11, s. 30-36.
- EGGIMANN, P. – GARBINO, J. – PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect. Dis.*, 2003, roč. 3, s. 85-702.
- ELIE, C. M., et al. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, roč. 36, s. 3260-3265.

- ENACHE-ANGOULVANT, A. – HENNEQUIN, C. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, roč. 41, s. 1159-1568.
- ENGER, L., et al. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, roč. 39, s. 658-669.
- FELL, J. W., et al. Partial rRNA sequences in marine yeasts: a model for identification of marine eucaryotes. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1992, roč. 1, s. 175-186. Převzato z Calderone 2002.
- FELSENSTEIN, J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 1989, roč. 5, s. 164-166.
- FIDEL, P. L. – VAZQUEZ, J. A. – SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: a review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, roč. 12, s. 80-96.
- FLAHAUT, M., et al. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, roč. 36, s. 395-401.
- FREYDIERE, A. M. – GUINET, R. - BOIRON, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med. Mycol.*, 2001, roč. 39, s. 9-33.
- FRIDKIN, S. K. – JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1996, roč. 9, s. 499-511.
- GALFLAND, D. H. *Taq* DNA polymerase. In: ERLICH, H. A. (ed.). *PCR technology: Principles and applications for DNA amplification*. 1989. New York: Stockton Press. 256 s.
- GHARIZADEH, B., et al. Identification of medically important fungi by the pyrosequencing technology. *Mycoses*, 2004, roč. 47, s. 29-33.
- GIGLIO, S. – MONIS, P. T. – SAINT, C. P. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res.* [online], 2003, roč. 31, e136. Dostupné z <<http://www.nar.oxfordjournals.org>>.
- GIRMENIA, C., et al. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. *Clin. Infect. Dis.*, 1996, roč. 23, s. 506-514.
- GOMEZ-LOPEZ, A., et al. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, roč. 52, s. 1506-1509.

- GUDLAUGSSON, O., et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, roč. 37, s. 1172-1177.
- GUNDRY, C. N., et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin. Chem.*, 2003, roč. 49, s. 396-406.
- HABER, J. – MALLÁTOVÁ, N. Voriconazol. *Farmakoterapie*, 2005, roč. 5, s. 443-462.
- HALL, L. – WOHLFIEL, S. – ROBERTS, G. D. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, roč. 41, s. 5099-5102.
- HAMAL, P., et al. A case of endocarditis caused by the yeast *Pichia fabianii* with biofilm production and developed *in vitro* resistance to azoles in the course of antifungal treatment. *Med. Mycol.*, 2008, roč. 46, s. 601-605.
- HAZEN, K. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1995, roč. 8, s. 462-478.
- HERRMANN, M. G., et al. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin. Chem.*, 2006, roč. 52, s. 494-503.
- HOBSON, R. P. The global epidemiology of invasive *Candida* infections: is the tide turning? *J. Hosp. Infect.*, 2003, roč. 55, s. 159-168.
- HOFFMAN, C. S. Preparation of yeast DNA, RNA and proteins. In: AUSUBEL, F. M., et al. (eds.). *Current protocols in molecular biology*. Vol. II, suppl. 24, 1994. Canada: John Wiley and Sons.
- HOLMBERG, K. – FEROUZE, F. Evaluation of an optimized system for random amplified polymorphic DNA (RAPD)-analysis for genotypic mapping of *Candida albicans* strains. *J. Clin. Lab. Anal.*, 1996, roč. 10, s. 59-69.
- HSU, M. C., et al. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J. Med. Microbiol.*, 2003, roč. 52, s. 1071-1076.
- HUGHES, M. S. – BECK, L. A. – SKUCE, R. A. Identification and elimination of DNA sequences in *Taq* DNA polymerase. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, roč. 32, s. 2007-2008.
- HUI, M., et al. Rapid identification of medically important *Candida* to species level by polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2000, roč. 38, s. 95-99.

- CHEN, Y. C., et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, roč. 38, s. 2302-2310.
- CHOI, J. H., et al. PhyloDraw: a phylogenetic tree drawing system. *Bioinformatics*, 2000, roč. 16, s. 1056-1058.
- JACOBSEN, M. D., et al. Molecular phylogenetic analysis of *Candida tropicalis* isolates by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet. Biol.*, 2008, roč. 45, s. 1040-1042.
- JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin. Infect. Dis.*, 1995, roč. 20, s. 1526-1530.
- JORDAN, J. A. PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, roč. 32, s. 2962-2967.
- KAN, V. L. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J. Infect. Dis.*, 1993, roč. 168, s. 779-783.
- KANBE, T., et al. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast*, 2002, roč. 19, s. 973-989.
- KEMPF, V. A. J. - TREBESIUS, K. - AUTENRIETH, I. B. Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, roč. 38, s. 830-838.
- KIEVITS, T., et al. NASBA isothermal enzymatic *in vitro* nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J. Virol. Methods*, 1991, roč. 35, s. 273-286.
- KOEHLER, A. P., et al. Simple, reliable and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, roč. 37, s. 422-426.
- KRCMERY, V. – BARNES, A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J. Hosp. Infect.*, 2002, roč. 50, s. 243-260.
- LARRIBA, G., et al. *Candida albicans* molecular biology reaches its maturity. *Internatl. Microbiol.*, 2000, roč. 3, s. 247-252.
- LAW, D., et al. High incidence of antifungal drug resistance in *Candida tropicalis*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1996, roč. 7, 241-245.
- LEAW, S. N., et al. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, roč. 44, s. 693-699.



- LEHMANN, L. E., et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2008, roč. 197, s. 313-324.
- LEHMANN, P. F. – LIN, D. – LASKER, B. A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, roč. 30, s. 3249-3254.
- LEINBERGER, D. M., et al. Development of a microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, roč. 43, s. 4943-4953.
- LI, W., et al. Complex DNA melting profiles of small PCR products revealed using SYBR Green I. *BioTechniques*, 2003, roč. 35, s. 702-706.
- LIN, D., et al. Three distinct genotypes within *C. parapsilosis* from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, roč. 33, s. 1815-1821.
- LIN, J. J. – KUO, J. – MA, J. A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Res.*, 1996, roč. 24, s. 3649-3650.
- LISCHEWSKI, A., et al. Detection and identification of *Candida* species in experimentally infected tissue and human blood by rRNA-specific fluorescent *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, roč. 35, s. 2943-2948.
- LIU, D., et al. Genetic speciation of *Candida* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, roč. 145, s. 23-26.
- LOCKHART, S. R., et al. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, roč. 46, s. 2659-2664.
- LOCKHART, S. R., et al. Identification and susceptibility profile of *Candida fermentati* from a worldwide collection of *Candida guilliermondii* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, roč. 47, s. 242-244.
- LOEFFLER, J., et al. Contaminations occurring in fungal PCR assays. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, roč. 37, s. 1200-1202.
- LOEFFLER, J., et al. Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, roč. 40, s. 2240-2243.

- LOEFFLER, J., et al. Development and evaluation of the Nuclisens Basic Kit NASBA for the detection of RNA from *Candida* species frequently resistant to antifungal drugs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2003, roč. 45, s. 217-220.
- LOUIE, M. – LOUIE, L. – SIMOR, A. E. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ*, 2000, roč. 163, s. 301-309.
- LUCAS, V. S., et al. Prevalence, intensity and nature of bacteraemia after toothbrushing. *J. Dent.*, 2008, roč. 36, s. 481-487.
- MAAROUFI, Y., et al. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, roč. 41, s. 3293-3298.
- MAAROUFI, Y., et al. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, roč. 42, s. 3159-3163.
- MAGEE, B. B. – MAGEE, P. T. Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.*, 1987, roč. 133, s. 425-430.
- MANNARELLI, B. M. – KURTZMAN, C. P. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, roč. 36, s. 1634-1641.
- MARDANI, M., et al. Nosocomial *Candida guilliermondii* fungemia in cancer patients. *Infect. Con. Hosp. Epidemiol.*, 2000, roč. 21, s. 310-313.
- MARTIN, C., et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, roč. 38, s. 3735-3742.
- McCLENNY, N. B., et al. Change in colony morphology of *Candida lusitanae* in association with development of amphotericin B resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, roč. 46, s. 1325-1328.
- McLAUGHLIN, R. W., et al. Are there naturally occurring pleomorphic bacteria in the blood of healthy humans? *J. Clin. Microbiol.*, 2002, roč. 40, s. 4771-4775.
- MELO, A. S., et al. Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Mycopathologia*, 1998, roč. 142, s. 57-66.
- MERZ, W. G. *Candida albicans* strain delineation. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1990, roč. 3, s. 21-334.
- MEUNIER, J. R. – GRIMONT, P. A. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.*, 1993, roč. 144, s. 373-379.

- MITCHELL, A. P. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1998, roč. 1, s. 687-692.
- MONOD, M., et al. The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. *J. Med. Microbiol.*, 1990, roč. 29, s. 123-129.
- MORACE, G., et al. Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, roč. 35, s. 667-672.
- MORAN, G. P., et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, roč. 41, s. 617-623.
- MORAN, G. P., et al. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, roč. 42, s. 1819-1830.
- MORRELL, M. – FRASER, V. J. – KOLLEF, M. H. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, roč. 9, s. 3640-3645.
- NAGLIK, J., et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell. Microbiol.*, 2004, roč. 6, s. 915-926.
- NATH, K., et al. Effects of ethidium bromide and SYBR Green I on different polymerase chain reaction systems. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2000, roč. 45, s. 15-29.
- NGUYEN, M. H., et al. The changing face of candidaemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am. J. Med.*, 1996, roč. 100, s. 617-623.
- NIKKARI, S., et al. Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? *J. Clin. Microbiol.*, 2001, roč. 39, s. 1956-1959.
- ODDS, F. C. – JACOBSEN, M. D. MLST of pathogenic *Candida* species. *Eukaryot. Cell*, 2008, roč. 7, s. 1075-1084.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L., et al. Amphotericin B: time for a new „gold standard“. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, roč. 37, s. 415-425.
- PAGE, R. D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.*, 1996, roč. 12, s. 357-358.

- PAPPAS, P. G., et al. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.*, 2004, roč. 8, s. 161-189.
- PASQUALOTTO, A. C. – DENNING, D. W. Diagnosis of invasive fungal infections: Current limitations of classical and new diagnostic methods. *Europ. Oncol. Rev.* [online], 2005, REV: 1-11. Dostupné z <www.touchoncology.com>.
- PENNER, G. A., et al. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl.*, 1993, roč. 2, s. 341–345.
- PFALLER, M. A. Epidemiology and control of fungal infections. *Clin. Infect. Dis.*, 1994, roč. 19, suppl. 1, s. S8-S13.
- PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin. Infect. Dis.*, 1996, roč. 22, suppl. 2, s. S89-S94.
- PFALLER, M. A., et al. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, roč. 35, s. 19-25.
- PFALLER, M. A., et al. *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, roč. 1, s. 78-83.
- PFALLER, M. A. – BYZKEN, L. – HOLLIS, R. J. *In vitro* activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, roč. 43, s. 5425-5427.
- PLACHÝ, R. – HAMAL, P. – RACLAVSKÝ, V. McRAPD as a new approach to rapid and accurate identification of pathogenic yeasts. *J. Microbiol. Methods*, 2005, roč. 60, s. 107-113.
- PONTÓN, J. – MORAGUES, M. D. – QUINDÓS, G. Non-culture-based diagnostics. In: CALDERONE, R. A. (ed.). *Candida and candidiasis*. 2002. Washington D.C.: ASM Press., s. 395-425.
- PRYCE, T. M., et al. Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Med. Mycol.*, 2003, roč. 41, s. 369-381.
- RACLAVSKÝ, V., et al. Primer R108 performs best in the RAPD strain typing of three *Aspergillus* species frequently isolated from patients. *Folia Microbiol.*, 2006, roč. 51, s. 136-140.

- REISS, E., et al. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med. Mycol.*, 1998, roč. 36, s. 249-257.
- REISS, E., et al. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med. Mycol.*, 2000, roč. 38, suppl. 1, s. S147-S159.
- REX, J. H., et al. Intravascular catheter exchange and duration of candidaemia. *Clin. Infect. Dis.*, 1995a, roč. 21, s. 994-996.
- REX, J. H. – RINALDI, M. G. – PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995b, roč. 39, s. 1-8.
- REX, J. H., et al. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.*, 2000, roč. 30, s. 662-678.
- RIGBY, S., et al. Fluorescence *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, roč. 40, s. 2182-2186.
- RIMEK, D., et al. Identification of contaminating fungal DNA sequences in zymolyase. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, roč. 37, s. 830-831.
- RIRIE, K. M. – RASMUSSEN, R. P. – WITWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 1997, roč. 245, s. 154-160.
- RUSTCHENKO-BULGAC, E. P. Variations of *Candida albicans* electrophoretic karyotypes. *J. Bacteriol.*, 1991, roč. 173, s. 6586-6596.
- RÝČOVSKÁ, A., et al. Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 2004, roč. 150, s. 1571-1580.
- SANDHU, G. S. S., et al. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, roč. 33, s. 2913-2919.
- SANGLARD, D. – BILLE, J. Current understanding of the modes of action of and resistance mechanisms to conventional and emerging antifungal agents for treatment of *Candida* infections. In: CALDERONE, R. A. (ed.). *Candida and candidiasis*. 2002. Washington D.C.: ASM Press. s. 349-384.
- SAN MILLÁN, R. M., et al. Clinical isolates of *Candida guilliermondii* include *Candida fermentati*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, roč. 47, s. 385-393.

- SANTALUCIA, J. – ALLAWI, H. T. – SENEVIRATNE, P. A. Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry*, 1996, roč. 35, s. 3555-3562.
- SELVARANGAN, R., et al. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, roč. 41, s. 5660-5664.
- SHEMER, R., et al. A highly polymorphic degenerate microsatellite for molecular strain typing of *Candida krusei*. *Microbiology*, 2001, roč. 147, s. 2021-2028.
- SCHERER, S. – STEVENS, D. A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, 1987, roč. 25, s. 675–679.
- SCHMIDT, T. M. – PACE, B. – PACE, N. R. Detection of DNA contamination in *Taq* polymerase. *Biotechniques*, 1991, roč. 11, s. 176-177.
- SNYDMAN, D. R. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections. *Chest*, 2003, roč. 123, suppl. 5, s. S500-S503.
- SOLL, D. R. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1992, roč. 5, s. 183-203.
- SONG, J. W., et al. Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med. Mycol.*, 2005, roč. 43, s. 657-661.
- STEFFAN, P., et al. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, roč. 35, s. 2031-2039.
- SULLIVAN, D. J., et al. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, roč. 31, s. 2124-2133.
- SULLIVAN, D. J., et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, 1995, roč. 141, s. 1507-1521.
- TAVANTI, A., et al. Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.*, 2005a, roč. 43, s. 5601-5613.
- TAVANTI, A., et al. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2005b, roč. 43, s. 5593-5600.
- TAVANTI, A., et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.*, 2005c, roč. 43, s. 284-292.

- TAVANTI, A., et al. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by AFLP reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, roč. 45, s. 1455-1462.
- TAYLOR, J. W. Making the *Deuteromycota* redundant: a practical integration of mitosporic and meiosporic fungi. *Can. J. Bot.*, 1995, roč. 73, suppl.1, s. S754-S759.
- THANOS, M., et al. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, roč. 34, s. 615-621.
- TIERNO, P. M. – MILSTOC, M. Germ-tube positive *Candida tropicalis*. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1977, roč. 68, s. 294-295.
- TYLER, K. D., et al. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprint of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, roč. 35, s. 339-346.
- VAN ASBECK, E. C., et al. Significant differences in drug susceptibility among species in the *C. parapsilosis* group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2008, roč. 62, s. 106-109.
- VENTO, S. – CAINELLI, F. Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: aetiology, prevention, and treatment. *Lancet*, 2003, roč. 4, s. 595-604.
- VOS, P., et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 1995, roč. 23, s. 4407-4414.
- VOSS, A., et al. Investigation of the sequence of colonization and candidaemia in non-neutropenic patients. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, roč. 32, s. 975-980.
- WALSH, T. J., et al. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, roč. 33, s. 3216-3220.
- WELSH, J. – McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, roč. 18, s. 7213-7218.
- WELSH, J. – McCLELLAND, M. Genomic fingerprinting with AP-PCR using pairwise combinations of primers: Application to genetic mapping of the mouse. *Nucleic Acids Res.*, 1991, roč. 19, s. 861-866.
- WHITE, P. L. – SHETTY, A. – BARNES, R. A. Detection of seven *Candida* species using the LightCycler system. *J. Med. Microbiol.*, 2003, roč. 52, s. 229-238.
- WIDJOJOATMODJO, M. N., et al. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) detection of medically important *Candida* species. *J. Microbiol. Methods*, 1999, roč. 38, s. 81-90.

- WILHELM, J. – PINGOUD, A. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem*, 2003, roč. 4, s. 1120-1128.
- WILLIAMS, J. G. K., et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, roč. 18, s. 1631-1635.
- WILLINGER, B. – MANAFI, M. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses*, 1999, roč. 42, s. 61-65.
- WILSON, D. A., et al. Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, roč. 43, s. 2909-2912.
- WINGARD, J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis.*, 1995, roč. 20, s. 115-125.
- WITTEWER, C. T., et al. The LightCycler: a microvolume multisampler fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 1997, 22, 176-181.
- WITTEWER, C. T., et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chem.*, 2003, roč. 49, s. 853-860.
- YANG, Y. L., et al. Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis. *BMC Infect. Dis.*, 2006, roč. 6, s. 5-8.
- YEO, S. F. – WONG, B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, roč. 15, s. 465-484.
- YOON, S. A., et al. High-frequency, in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, roč. 43, s. 836-845.
- ZIPPER, H., et al. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* [online], 2004, roč. 32, e103. Dostupné z <<http://www.nar.oxfordjournals.org>>.
- ZOLAN, M. E. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol. Rev.*, 1995, roč. 59, s. 686-698.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-FC	5-fluorocytosin
A, C, G, T	adenin, cytosin, guanin, thymin
AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných restrikčních fragmentů (angl. amplified fragment length polymorphism)
AIDS	syndrom získaného selhání imunity (angl. acquired immune deficiency syndrome)
AP-PCR	PCR s náhodnými primery (angl. arbitrarily primed PCR)
bp	páry bází
BSA	hovězí sérový albumin (angl. bovine serum albumin)
CAAL	<i>Candida albicans</i>
CAGL	<i>Candida glabrata</i>
CAGU	<i>Candida guilliermondii</i>
CAKR	<i>Candida krusei</i>
CALU	<i>Candida lusitaniae</i>
CAMP	<i>Candida metapsilosis</i>
CAOP	<i>Candida orthopsilosis</i>
CAPA	<i>Candida parapsilosis</i>
CAPE	<i>Candida pelliculosa</i>
CATR	<i>Candida tropicalis</i>
cDNA	komplementární DNA (angl. complementary DNA)
CFU	jednotky tvořící kolonie (angl. colony forming unit)
CNS	centrální nervový systém
CSF	mozkomíšní mok (angl. cerebrospinal fluid)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxynukleosid trifosfáty
dsDNA	dvouvláknová DNA (angl. double-stranded DNA)
EDTA	ethylendiaminetetraoctová kyselina
EIA	enzymová imunisorbční analýza (angl. enzyme immunoassay)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FRET	rezonanční přenos energie (angl. fluorescence resonance energy transfer)
HIV	virus způsobující ztrátu obranyschopnosti u člověka (angl. human immunodeficiency virus)
HRMA	analýza tání s vysokým rozlišením (angl. high resolution melting analysis)
HSC	hematopoetická kmenová buňka (angl. hematopoietic stem cell)
ITS	vnitřní přepisovaný mezerník (angl. internal transcribed spacer)
kb	kilobáze
LED	elektroluminiscenční dioda (angl. light-emitting diode)

McRAPD	analýza tání produktů RAPD (angl. melting curve of random amplified polymorphic DNA)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (angl. minimal inhibitory concentration)
MLST	multilokusová sekvenční typizace (z angl. multilocus sequence typing)
Mx	master mix
NAC	jiný druh kandid než <i>Candida albicans</i> (angl. non- <i>albicans Candida</i> )
NASBA	angl. nucleic acid sequence-based amplification
OD	optická denzita
pb	pár bází
PCR	polymerázová řetězová reakce (angl. polymerase chain reaction)
PFGE	pulzní gelová elektroforéza (angl. pulsed field gel electrophoresis)
PNA	peptidová nukleová kyselina (angl. peptide nucleic acid)
QAS	program pro srovnávání podobnosti křivek tání
RAPD	náhodně amplifikovaná polymorfni DNA (random amplified polymorphic DNA)
REA	restrikční enzymová analýza
RFLP	polymorfizmus restrikčních fragmentů (angl. restriction fragment length polymorphism)
rRNA	ribozomální RNA
S	Svedbergova sedimentační konstanta
SACE	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	směrodatná odchylka (angl. standard deviation)
SDS	dodecylsulfát sodný (angl. sodium dodecyl sulfate)
SG	SYBR Green I
SNP	bodový polymorfizmus (angl. single nucleotide polymorphism)
SSCP	analýza konformačního polymorfizmu jednovláknové DNA (angl. single-strand conformation polymorphism analysis)
ssDNA	jednovláknová DNA (angl. single-stranded DNA)
TBE pufr	Tris/borát/EDTA pufr
TE pufr	Tris/EDTA pufr
T <sub>m</sub>	teplota tání (angl. melting temperature)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	jednotka enzymové aktivity
UPGMA	metoda párování pomocí nevážených aritmetických průměrů (angl. unweighted pair-group method using arithmetic averages)
UV	ultrafialové záření (angl. ultraviolet)
VATER	syndrom, z angl. vertebrae, anus, trachea, esophagus, renal
VPS	ventikuloperitoneální zkrat (angl. ventriculoperitoneal shunt)
w/v	hmotnostní zlomek, z angl. weight/volume
YPG	tekuté živné médium, z angl. yeast extract, peptone, glucose

## SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A** – Klinické izoláty a referenční kmeny použité pro ověření identifikační schopnosti McRAPD
- Příloha B** – Matice relativních vzdáleností získaná automatizovaným srovnáním normalizovaných McRAPD dat izolátů *C. guilliermondii*
- Příloha C** – Dendrogramy sestavené na základě UPGMA analýzy normalizovaných McRAPD dat jednotlivých druhů
- Příloha D** – Dendrogram sestavený z RAPD fingerprintů souboru izolátů pro ověření identifikační schopnosti McRAPD
- Příloha E** – Průměrné derivované křivky tání jednotlivých druhů/genotypů získané McRAPD analýzou
- Příloha F** – Průměrné teploty tání odečtené z píků derivovaných křivek tání jednotlivých druhů/genotypů
- Příloha G** – Příklad vizuálního hodnocení podobnosti derivovaných křivek
- Příloha H** – Soubor izolátů *C. albicans* pro ověření vnitrodruhové typizační schopnosti metody McRAPD
- Příloha I** – Karyotypy souboru izolátů *C. albicans* odebraných od pacienta s VATER syndromem v průběhu dvou let
- Příloha J** – Příklad kombinované identifikace automatizovanou metodou McRAPD po předběžné identifikaci na CHROMagaru
- Příloha K** – Seznam obrázků a tabulek

**Příloha A.1** – Klinické izoláty a referenční kmeny použité pro ověření identifikační schopnosti McRAPD

<b>Druh</b>	<b>Kmen</b>	<b>Zdroj</b>
<b><i>Candida albicans</i></b>	I1-CAAL2-36	Sputum
	I1-CAAL2-05	Krk
	I1-CAAL2-37	Nehet
	I1-CAAL2-38	Stolice
	I1-CAAL2-39	Moč
	I1-CAAL2-06	BAL
	I1-CAAL2-07	Stolice
	I1-CAAL2-40	Kanyla
	I3-CAAL3-01	Kůže
	I1-CAAL-39	Punktát
	I3-CAAL3-02	Žaludeční sekret
	I1-CAAL2-09	Kanyla
	I3-CAAL3-03	Katetr
	I3-CAAL3-04	Sputum
	I3-CAAL3-05	Stolice
	I1-CAAL-38	Žaludeční sekret
	I1-CAAL2-08	Krk
	I1-CAAL-40	Kanyla
	I1-CAAL2-01	Stolice
	I3-CAAL3-06	Žluč
	I3-CAAL3-07	Kanyla
	I3-CAAL3-08	Pochva
	I3-CAAL3-09	Drén
	I3-CAAL3-10	Pochva
	I1-CAAL2-03	Dutina ústní
	I3-CAAL3-11	Ucho
	I3-CAAL3-12	Žluč
	I3-CAAL3-13	Stolice
	I1-CAAL2-10	Kanyla
	I3-CAAL3-14	Hemokultura
	I3-CAAL3-15	Hemokultura
	I3-CAAL3-16	Hemokultura
I3-CAAL3-17	Hemokultura	
I3-CAAL3-18	Poskytnul Dr. Yücesoy	
I3-CAAL3-19	Poskytnul Dr. Yücesoy	
I3-CAAL3-20	Poskytnul Dr. Yücesoy	
I3-CAAL3-21	Poskytnul Dr. Yücesoy	
I3-CAAL3-22	Poskytnul Dr. Yücesoy	
I3-CAAL3-23	Poskytnul Dr. Yücesoy	
CCY 29-3-32	Referenční kmen	
ATCC 76615	Referenční kmen	
<b><i>Candida tropicalis</i></b>	I1-CATR-17	Rána
	I1-CATR-36	Dutina ústní
	I3-CATR8-28	Moč
	I3-CATR9-01	Sputum
	I3-CATR9-02	Ucho
	I3-CATR9-03	Žluč
	I3-CATR9-04	Katetr
I3-CATR9-05	Sekret	
I3-CATR9-06	Aspirát	

Příloha A.2

	I3-CATR9-07	Punktát
	I3-CATR9-08	Stolice
	I3-CATR9-09	Pochva
	I3-CATR9-10	Dutina ústní
	I3-CATR9-10	Dutina ústní
	I3-CATR9-11	Nehet
	I3-CATR9-12	Dutina ústní
	I3-CATR9-13	Krk
	I3-CATR9-14	Žluč
	I3-CATR9-15	Nehet
	I3-CATR9-16	Dutina ústní
	I3-CATR9-17	Dutina ústní
	I3-CATR9-18	Krk
	I3-CATR9-19	Krk
	I3-CATR9-20	Nehet
	I3-CATR9-21	Moč
	I3-CATR9-22	Kanyla
	I3-CATR9-23	Kanyla
	I3-CATR9-24	Kanyla
	I3-CATR9-25	Rektum
	I3-CATR9-26	Krk
	I3-CATR9-27	Stolice
	I3-CATR9-28	Kanyla
	I3-CATR9-29	Moč
	I3-CATR9-30	Stolice
	I3-CATR9-31	Hemokultura
	I3-CATR9-32	Hemokultura
	I3-CATR9-33	Hemokultura
	I3-CATR9-34	Poskytnul Dr. Yücesoy
	I3-CATR9-35	Poskytnul Dr. Yücesoy
	I3-CATR9-36	Poskytnul Dr. Yücesoy
	I3-CATR9-37	Poskytnul Dr. Yücesoy
	CCY 29-7-12	Referenční kmen
<b><i>Candida krusei</i></b>	I1-CAKR-03	Rektum
	I1-CAKR-04	BAL
	I1-CAKR-05	Píštěl stěr
	I1-CAKR-06	BAL
	I1-CAKR-07	Krk
	I1-CAKR-08	Sputum
	I1-CAKR-10	Stolice
	I1-CAKR-11	Pochva
	I1-CAKR-12	Krk
	I1-CAKR-24	Krk
	I3-CAKR2-09	Krk
	I3-CAKR2-10	BAL
	I3-CAKR2-11	Moč
	I3-CAKR2-12	Sputum
	I3-CAKR2-13	Pochva
	I3-CAKR2-14	Sputum
	I3-CAKR2-15	Sputum
	I3-CAKR2-16	Sputum
	I3-CAKR2-17	Krk

**Příloha A.3**

	I3-CAKR2-18	Krk
	I3-CAKR2-19	Rána
	I3-CAKR2-20	Rána
	I3-CAKR2-21	Sputum
	I3-CAKR2-22	Moč
	I3-CAKR2-23	Pochva
	I3-CAKR2-24	Sputum
	I3-CAKR2-25	Krk
	I3-CAKR2-26	Krk
	I3-CAKR2-27	Sputum
	I3-CAKR2-28	Moč
	I3-CAKR2-29	Moč
	I3-CAKR2-30	Žluč
	I3-CAKR2-31	Hemokultura
	I3-CAKR2-32	Hemokultura
	I3-CAKR2-33	Hemokultura
	I3-CAKR2-34	Hemokultura
	I3-CAKR2-35	Hemokultura
	ATCC 90878	Referenční kmen
	CCY 29-9-17	Referenční kmen
<b><i>Candida parapsilosis</i></b>	I3-CAPA7-01	Kanyla
	I3-CAPA7-02	Pochva
	I3-CAPA7-03	Ucho
	I3-CAPA7-04	Moč
	I3-CAPA7-05	Ucho
	I3-CAPA7-06	Moč
	I3-CAPA7-07	Pochva
	I3-CAPA7-08	Kanyla
	I3-CAPA7-09	Krk
	I3-CAPA7-10	Rána
	I3-CAPA7-11	Mozkové pleny
	I3-CAPA7-12	Spojivka
	I3-CAPA7-13	Spojivka
	I3-CAPA7-14	Rána
	I3-CAPA7-15	Nehet
	I3-CAPA7-16	Nehet
	I3-CAPA7-17	Nehet
	I3-CAPA7-18	Nehet
	I3-CAPA7-19	Nehet
	I3-CAPA7-20	Krk
	I3-CAPA7-21	Ucho
	I3-CAPA7-22	Ucho
	I3-CAPA7-23	Moč
	I3-CAPA7-24	Kanyla
	I3-CAPA7-25	Moč
	I3-CAPA7-26	Kůže
	I3-CAPA7-27	Ucho
	I3-CAPA7-28	Kanyla
	I3-CAPA7-29	Kanyla
	I3-CAPA7-30	Kanyla
	I3-CAPA7-31	Sputum
	I3-CAPA7-32	Dialyzační tekutina

Příloha A.4

	I3-CAPA7-33	Nehet
	I3-CAPA7-34	Nehet
	I3-CAPA7-35	Hemokultura
	I3-CAPA7-36	Hemokultura
	I3-CAPA7-37	Hemokultura
	I3-CAPA7-38	Hemokultura
	ATCC 90018	Referenční kmen
	CCY 29-20-8	Referenční kmen
	CBS 604	Referenční kmen
<b><i>Candida glabrata</i></b>	I1-CAGL-30	Stolice
	I1-CAGL-31	Moč
	I1-CAGL-32	Moč
	I1-CAGL-33	Sputum
	I1-CAGL-34	Perianální stěr
	I1-CAGL-35	Rektální stěr
	I1-CAGL-36	Pochva
	I1-CAGL-37	Kanyla
	I1-CAGL-38	Sputum
	I1-CAGL-39	Sputum
	I1-CAGL-40	Krk
	I3-CAGL2-01	Sputum
	I3-CAGL2-02	Moč
	I3-CAGL2-03	Krk
	I3-CAGL2-04	Dutina ústní
	I3-CAGL2-05	BAL
	I3-CAGL2-06	Močový katetr
	I3-CAGL2-07	Rána
	I3-CAGL2-08	BAL
	I3-CAGL2-09	Rána
	I3-CAGL2-10	Perianální stěr
	I3-CAGL2-11	Pochva
	I3-CAGL2-12	BAL
	I3-CAGL2-13	Kanyla
	I3-CAGL2-14	Pochva
	I3-CAGL2-15	Kanyla
	I3-CAGL2-16	Pochva
	I3-CAGL2-17	Sputum
	I3-CAGL2-18	Krk
	I3-CAGL2-19	Katetr- píštěl
	I3-CAGL2-20	Kanyla
	I3-CAGL2-21	Žluč
	I3-CAGL2-22	Pochva
	I3-CAGL2-23	Sekret
	I3-CAGL2-24	Kanyla
	I3-CAGL2-25	Hemokultura
	I3-CAGL2-26	Hemokultura
	I3-CAGL2-27	Hemokultura
	I3-CAGL2-28	Hemokultura
	ATCC 90080	Referenční kmen
	CCY 26-20-21	Referenční kmen
<b><i>Candida lusitanae</i></b>	I1-CALU2-29	Kůže

Příloha A.5

	I1-CALU2-30	Krk
	I1-CALU2-31	Krk
	I1-CALU2-32	Katetr
	I1-CALU2-33	Sputum
	I1-CALU2-34	Stolice
	I1-CALU2-35	Moč
	I1-CALU2-36	Krk
	I1-CALU2-37	Moč
	I1-CALU2-38	Moč
	I1-CALU2-39	Moč
	I1-CALU2-40	Sekret z rány
	I3-CALU3-01	Katetr
	I3-CALU3-02	Sputum
	I3-CALU3-03	Hemokultura
	I3-CALU3-04	Nehet
	I3-CALU3-05	Moč
	I3-CALU3-06	Ucho
	I3-CALU3-07	Krk
	I3-CALU3-08	Moč
	I3-CALU3-09	Rána
	I3-CALU3-10	Kanyla
	I3-CALU3-11	Krk
	I3-CALU3-12	Moč
	I3-CALU3-13	Sputum
	I3-CALU3-14	Krk
	I3-CALU3-15	Moč
	I3-CALU3-16	Krk
	I3-CALU3-17	Krk
	I3-CALU3-18	Nehet
	I3-CALU3-19	Krk
	I3-CALU3-20	Krk
	I3-CALU3-21	Moč
	I3-CALU3-22	Krk
	I3-CALU3-23	Krk
	I3-CALU3-24	Kanyla
	I3-CALU3-25	Moč
	I3-CALU3-26	Moč
	I3-CALU3-27	Stolice
	I1-CALU-33	Kanyla
	CCY 29-59-1	Referenční kmen
<b><i>Candida pelliculosa</i></b>	I1-CAPE2-35	Krk
	I1-CAPE2-36	Moč
	I1-CAPE2-37	Moč
	I1-CAPE2-38	Krk
	I1-CAPE2-39	Sputum
	I1-CAPE2-40	Dutina ústní
	I3-CAPE3-01	Moč
	I3-CAPE3-02	Krk
	I3-CAPE3-03	Moč
	I3-CAPE3-04	Krk
	I3-CAPE3-05	Moč
	I3-CAPE3-06	Moč



Příloha A.6

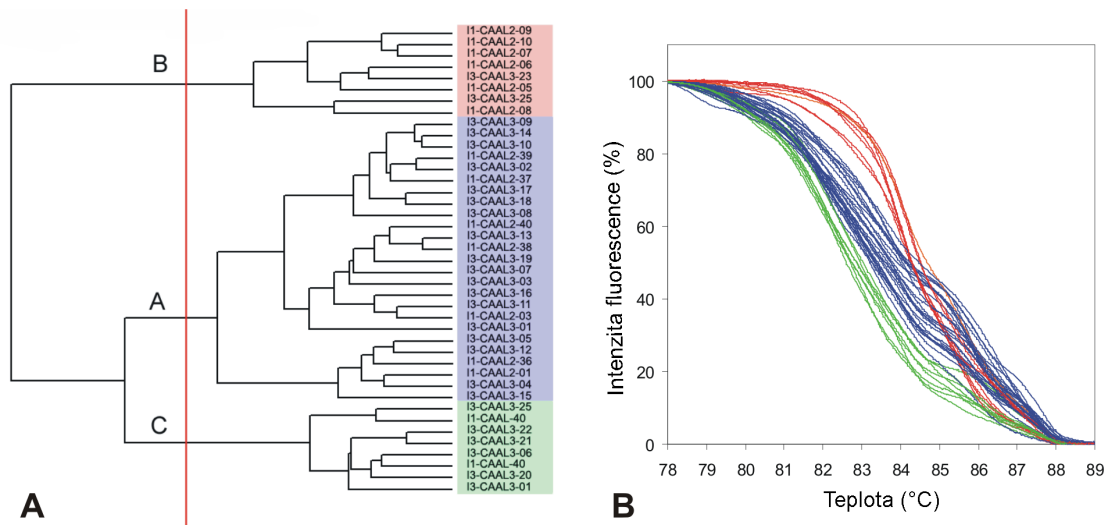
	I3-CAPE3-07	Stolice
	I3-CAPE3-08	Kanyla
	I3-CAPE3-09	Krk
	I3-CAPE3-10	Moč
	I3-CAPE3-11	Krk
	CCY 29-6-4	Referenční kmen
	CCY 29-6-7	Referenční kmen
	CCY 29-6-8	Referenční kmen
<b><i>Candida guilliermondii</i></b>	I1-CAGU-22	Kanyla
	I1-CAGU2-20	Moč
	I1-CAGU2-21	Ucho
	I1-CAGU2-22	Krk
	I1-CAGU2-23	Nehet
	I1-CAGU2-24	Nehet
	I1-CAGU2-25	Sputum
	I1-CAGU2-26	Nehet
	I1-CAGU2-27	Nehet
	I1-CAGU2-28	Stěr z rány
	I1-CAGU2-29	Hemokultura
	I1-CAGU2-30	Moč
	I1-CAGU2-31	Kůže
	I1-CAGU2-32	Nehet
	I1-CAGU2-33	Krk /nos
	I1-CAGU2-34	Ucho
	I1-CAGU2-35	Kůže
	I1-CAGU2-36	Kůže
	I1-CAGU2-37	Dutina ústní
	I1-CAGU2-38	Stěr z rány
	I1-CAGU2-39	Sputum
	I1-CAGU2-40	Krk
	CCY 29-4-21	Referenční kmen
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	I1-SACE2-38	Krk
	I1-SACE2-39	Pochva
	I1-SACE2-40	Perianální stěr
	I3-SACE3-01	Pochva
	I3-SACE3-02	Kůže
	I3-SACE3-03	Stolice
	I3-SACE3-04	Krk
	I3-SACE3-05	Jazyk
	I3-SACE3-06	Krk
	I3-SACE3-07	Stolice
	I3-SACE3-08	Perianální stěr
	I3-SACE3-09	Pochva
	I3-SACE3-10	Perianální stěr
	I3-SACE3-11	Stolice
	I3-SACE3-12	Stolice
	I3-SACE3-13	Krk
	I3-SACE3-14	Absces
	I3-SACE3-15	Krk
	I3-SACE3-16	Pochva
	I3-SACE3-17	Pochva

Příloha A.7

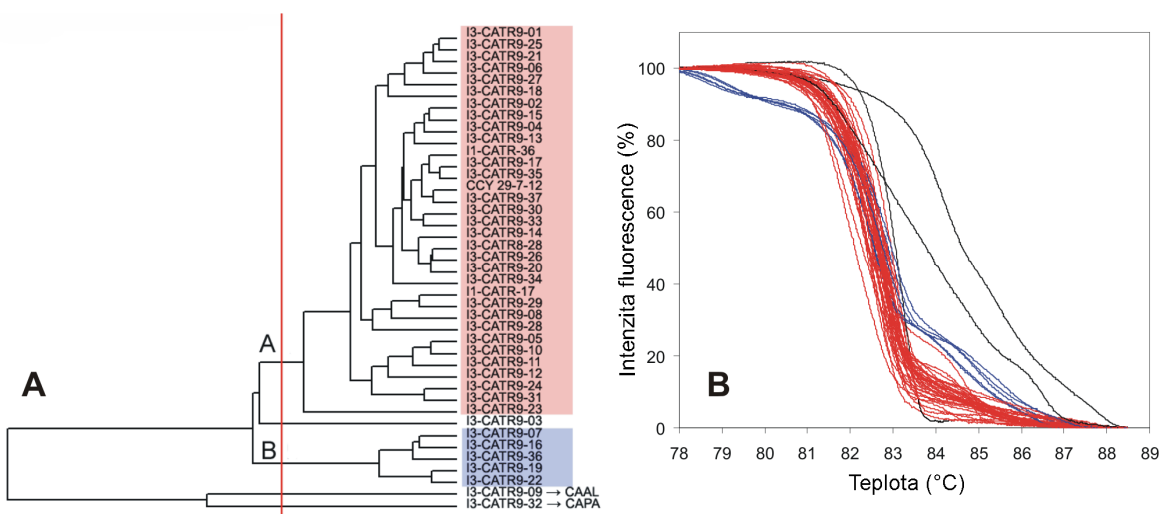
	I3-SACE3-18	Sputum
	I3-SACE3-19	Krk
	I3-SACE3-20	Dutina ústní
	I3-SACE3-21	Sputum
	I3-SACE3-22	Pochva
	I3-SACE3-23	Sputum
	I3-SACE3-24	Krk
	I3-SACE3-25	Nail
	I3-SACE3-26	Pochva
	I3-SACE3-27	Krk
	I3-SACE3-28	Stolice
	I3-SACE3-29	Kůže
	I3-SACE3-30	Sputum
	I3-SACE3-31	Krk
	I3-SACE3-32	Pochva
	I3-SACE3-33	Pochva
	I3-SACE3-34	Rána
	I3-SACE3-35	Sekret
	I3-SACE3-36	Dutina ústní
	I3-SACE3-37	Pochva
<b><i>Candida orthopsilosis</i></b>	MCO 456	Referenční kmen
	I1-CAOP-02	Hemokultura
	I1-CAOP-03	Hemokultura
<b><i>Candida metapsilosis</i></b>	MCO 448	Referenční kmen
	CBS 2916	Referenční kmen



**Příloha C.1 – Dendrogramy sestavené na základě UPGMA analýzy normalizovaných McRAPD dat jednotlivých druhů**

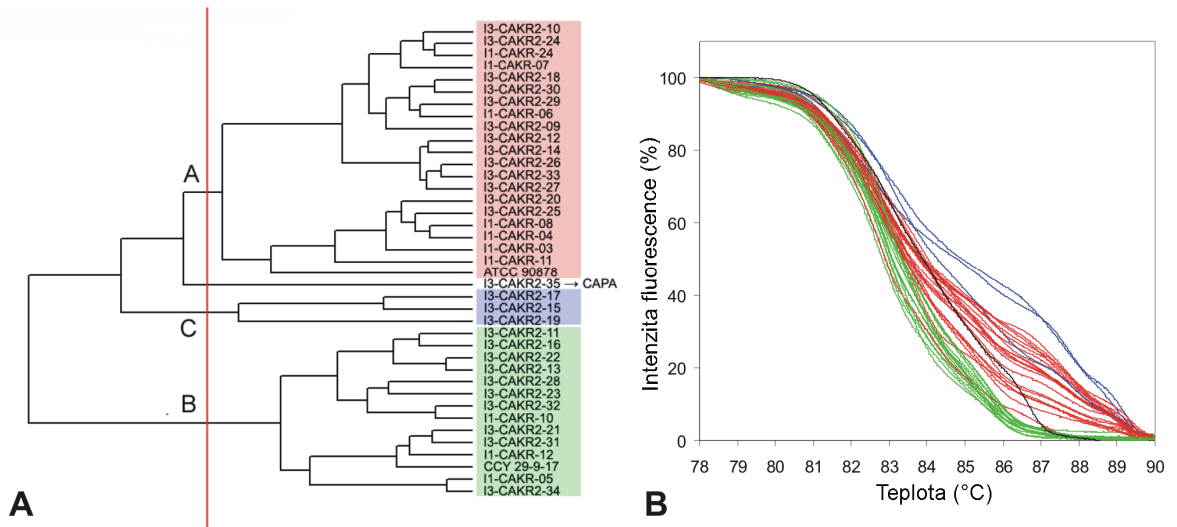


Obr. C.1-1 – Dendrogram kmenů *C. albicans* vycházející z normalizovaných McRAPD dat. V části A je uveden dendrogram s empiricky definovanými genotypy a v části B odpovídající normalizované křivky tání. Kmeny náležící určitému genotypu jsou zvýrazněny v dendrogramu jednotnou podkladovou barvou a toutéž barvou u souvisejících normalizovaných křivek tání. Kmeny, které nebyly zařazeny k žádnému genotypu, nejsou v dendrogramu barevně zvýrazněny a odpovídající křivka tání je černá.

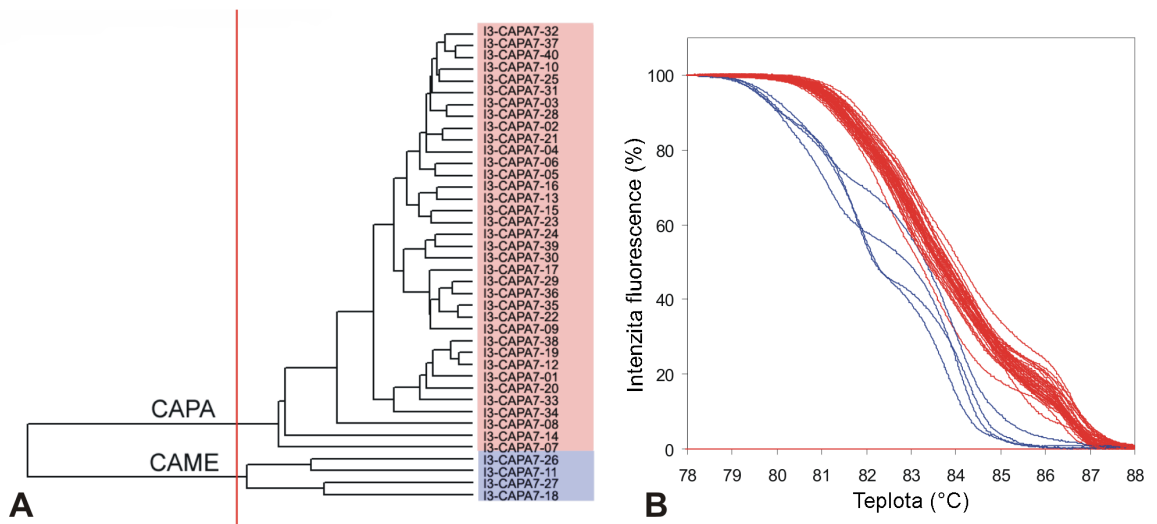


Obr. C.1-2 – Dendrogram kmenů *C. tropicalis* vycházející z normalizovaných McRAPD dat. Legenda stejná jako u obr. C.1-1.

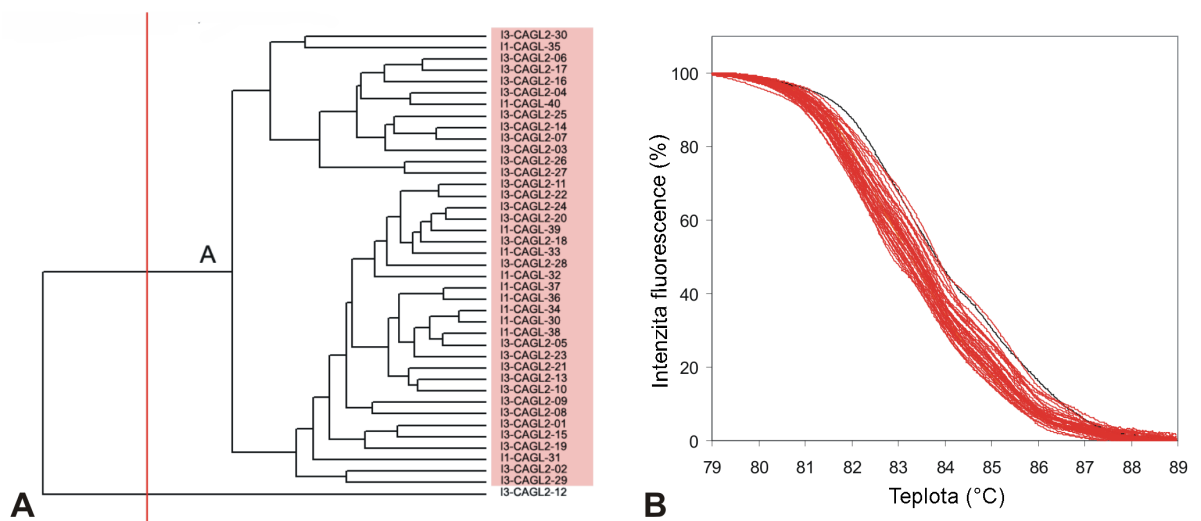
**Příloha C.2**



Obr. C.2-1 – Dendrogram kmenů *C. krusei* vycházející z normalizovaných McRAPD dat.  
Legenda stejná jako u obr. C.1-1.

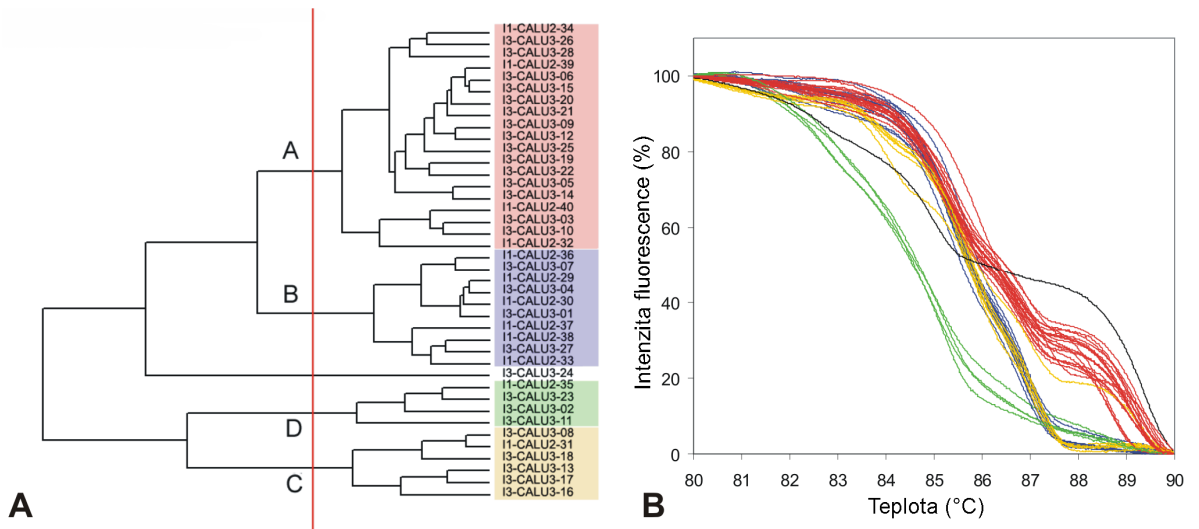


Obr. C.2-2 – Dendrogram kmenů *C. parapsilosis* vycházející z normalizovaných McRAPD dat.  
Legenda stejná jako u obr. C.1-1.

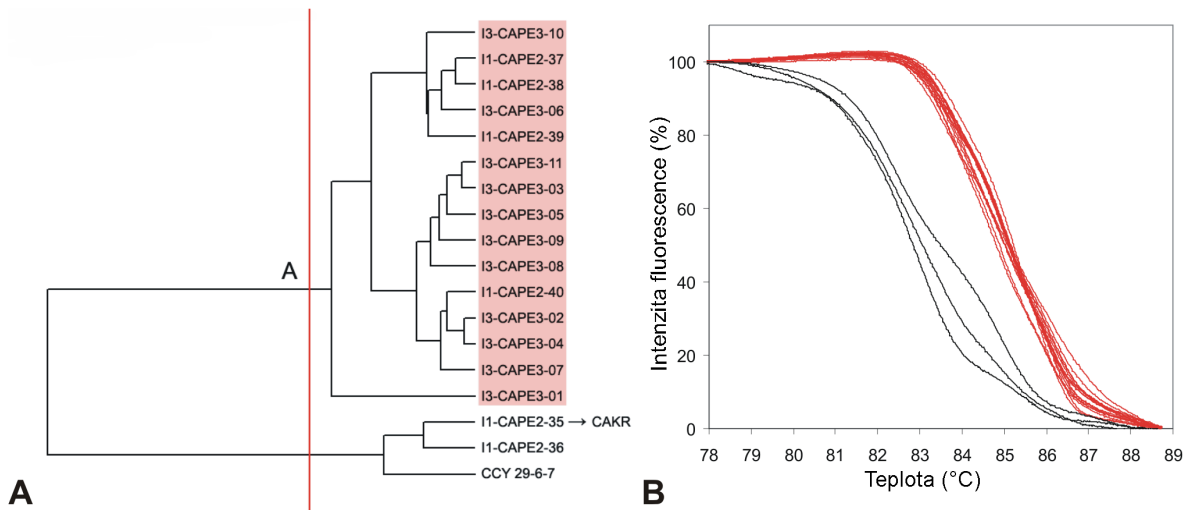


Obr. C.2-3 – Dendrogram kmenů *C. glabrata* vycházející z normalizovaných McRAPD dat.  
Legenda stejná jako u obr. C.1-1.

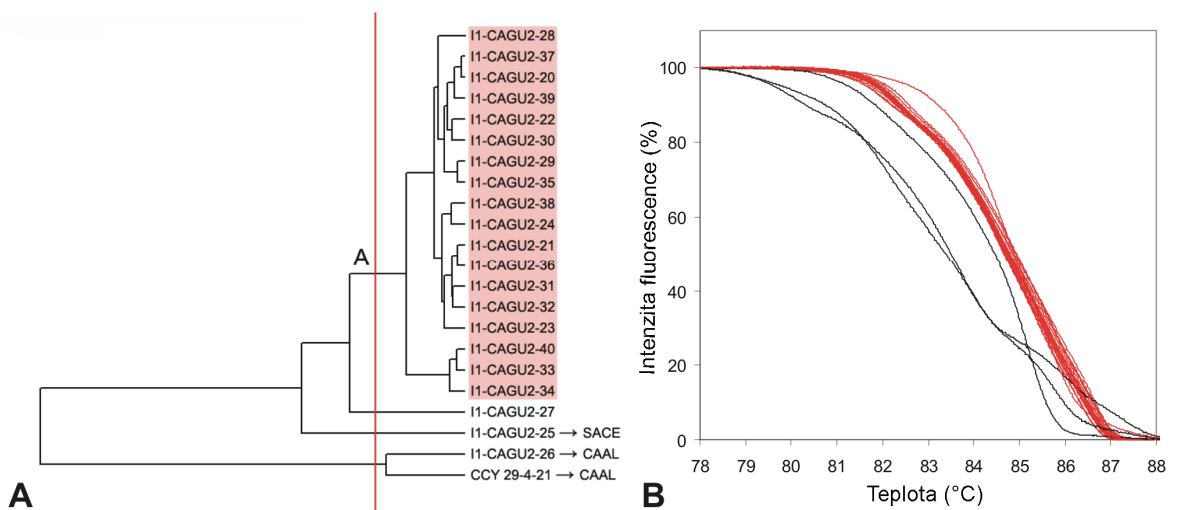
**Příloha C.3**



Obr. C.3-1 – Dendrogram kmenů *C. lusitaniae* vycházející z normalizovaných McRAPD dat. Legenda stejná jako u obr. C.1-1.

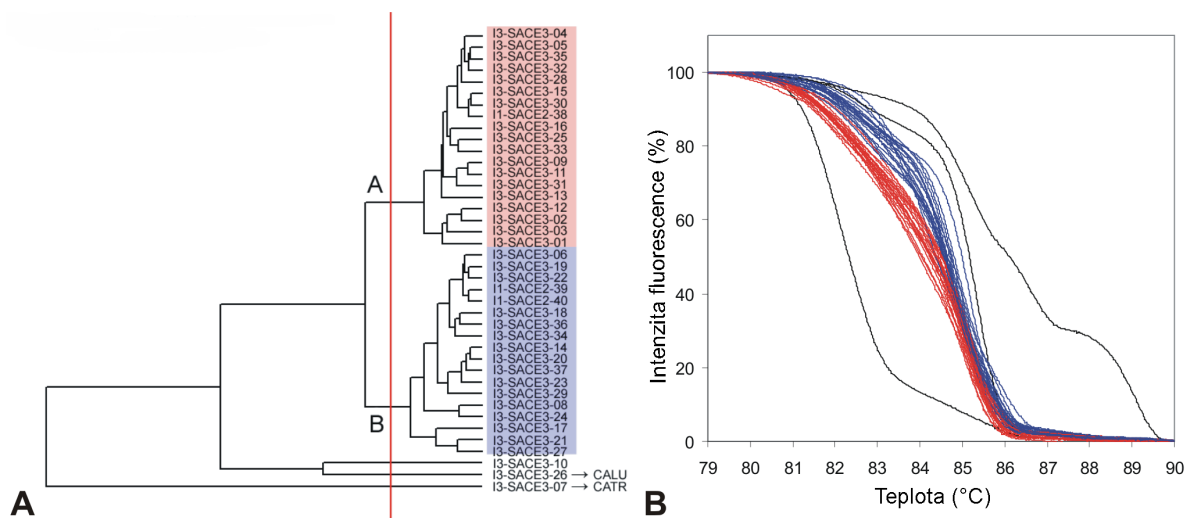


Obr. C.3-2 – Dendrogram kmenů *C. pelliculosa* vycházející z normalizovaných McRAPD dat. Legenda stejná jako u obr. C.1-1.



Obr. C.3-3 – Dendrogram kmenů *C. guilliermondii* vycházející z normalizovaných McRAPD dat. Legenda stejná jako u obr. C.1-1.

## Příloha C.4



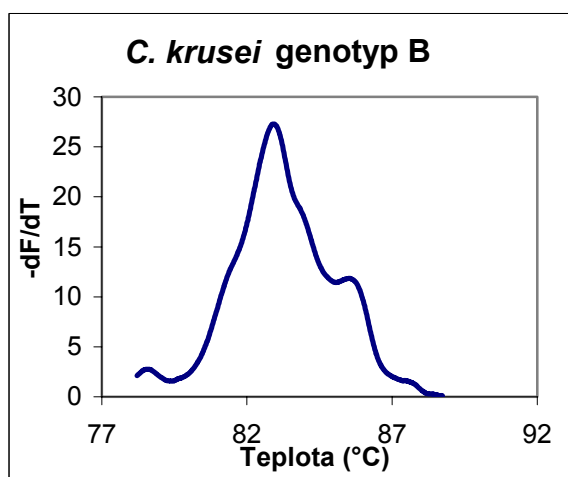
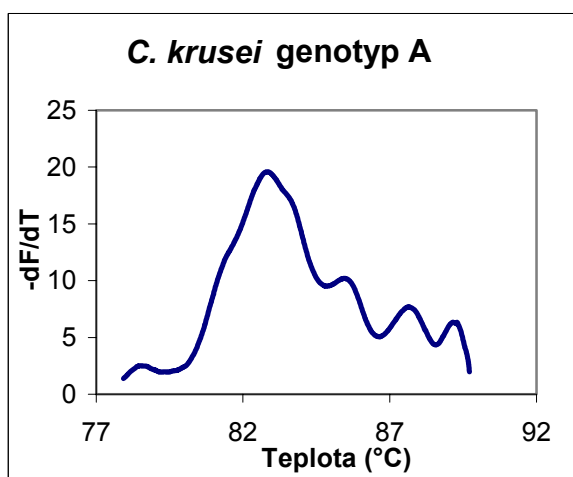
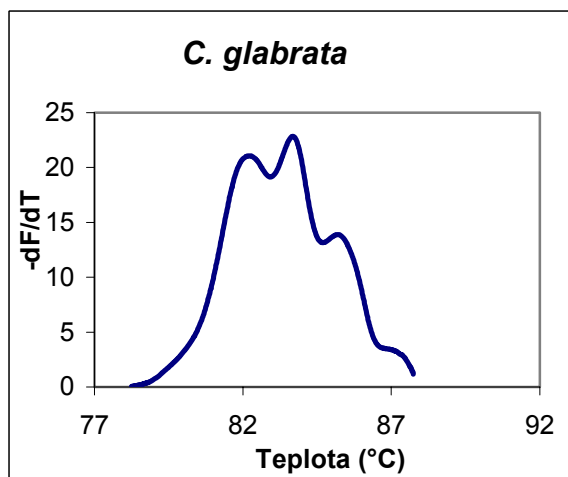
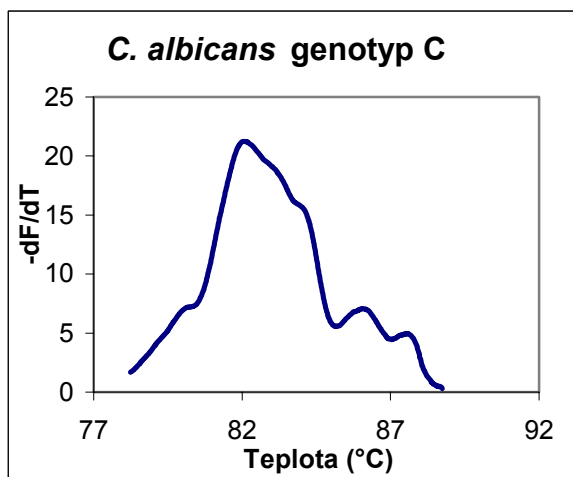
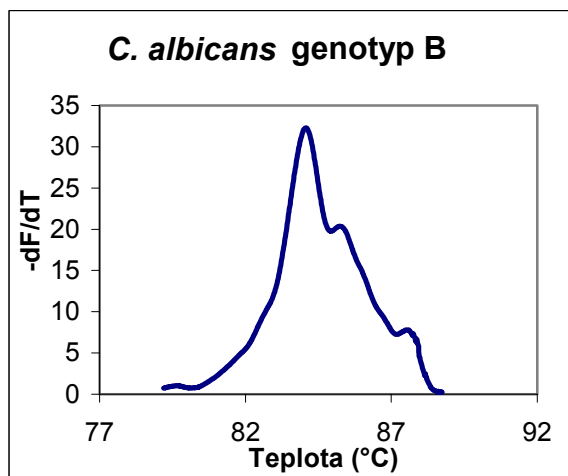
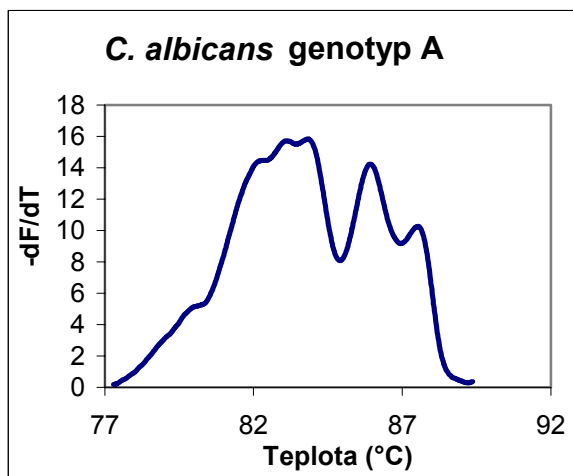
Obr. C.4-1 – Dendrogram kmenů *S. cerevisiae* vycházející z normalizovaných McRAPD dat. Legenda stejná jako u obr. C.1-1.



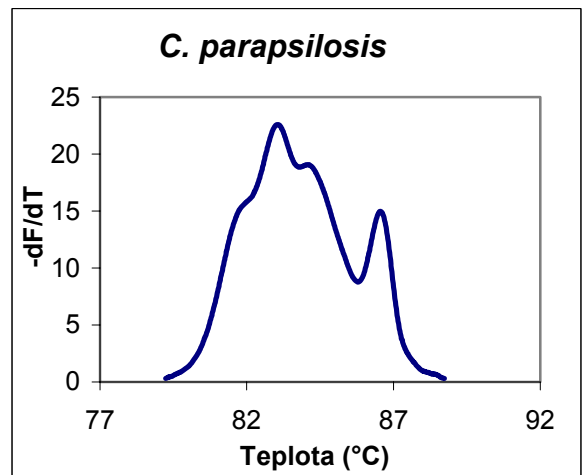
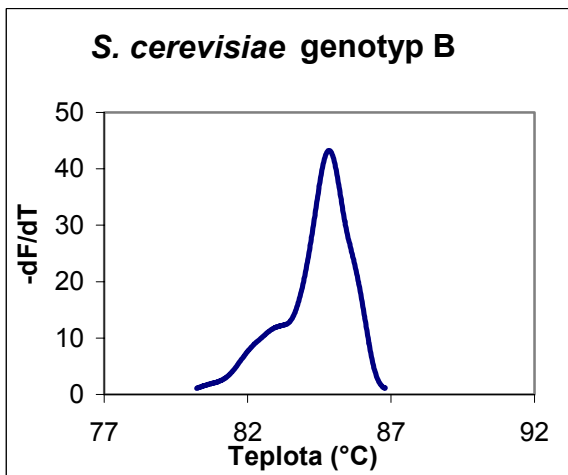
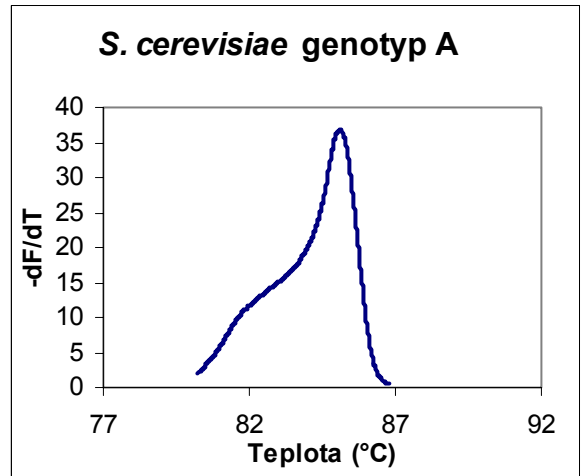
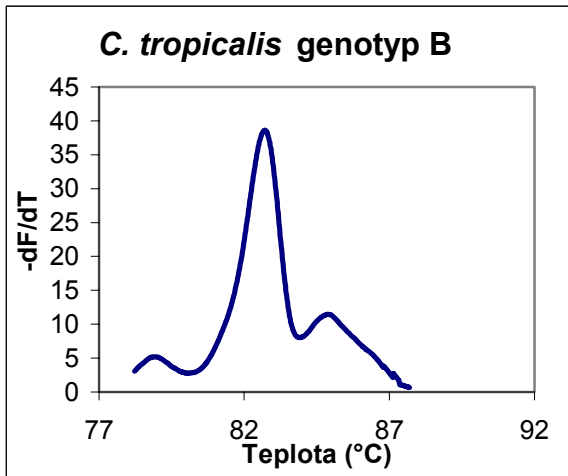
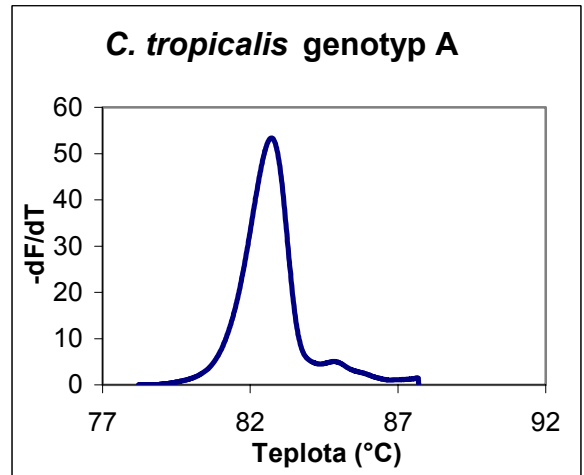
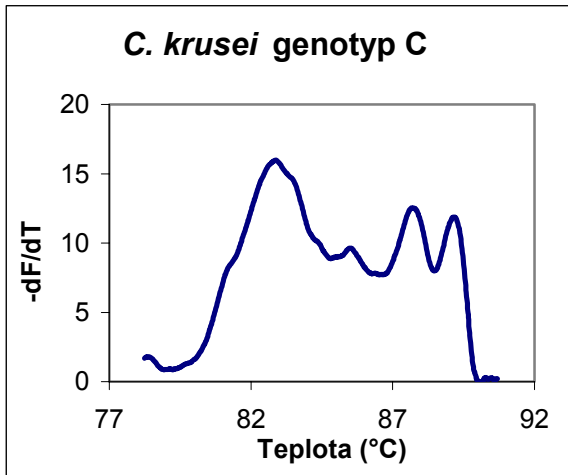




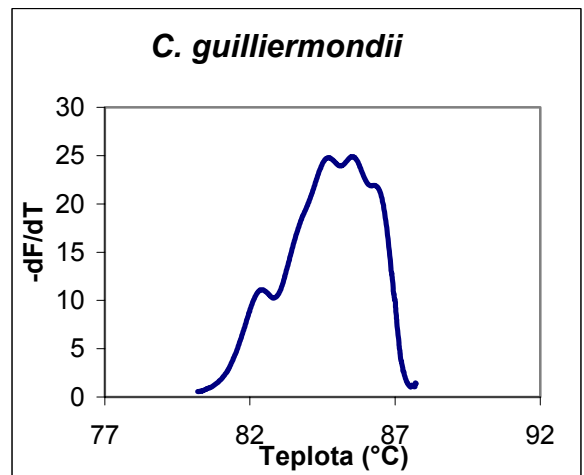
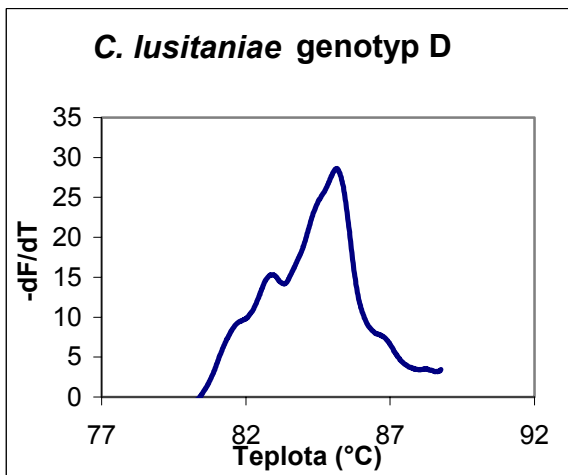
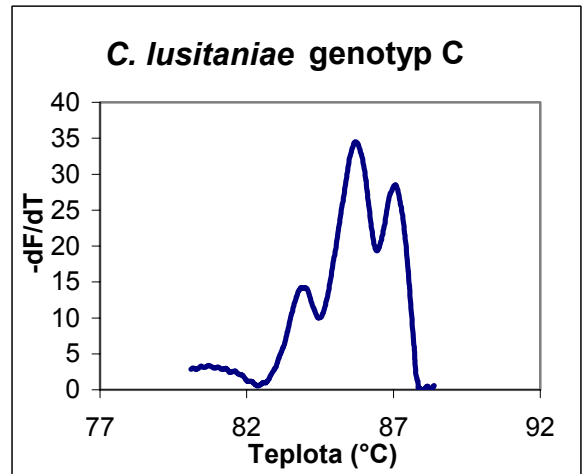
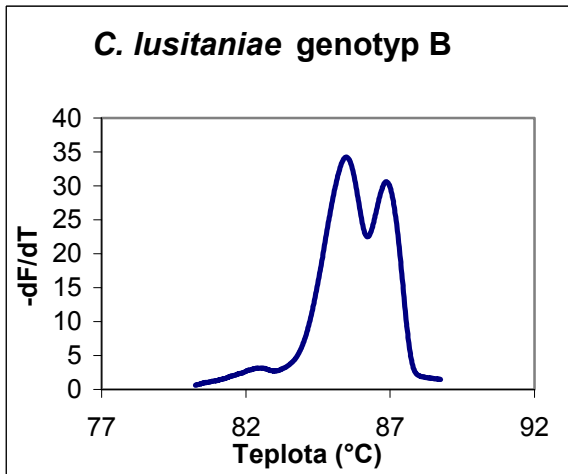
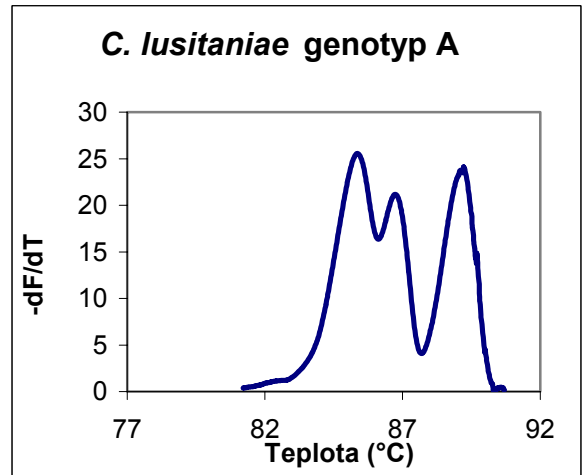
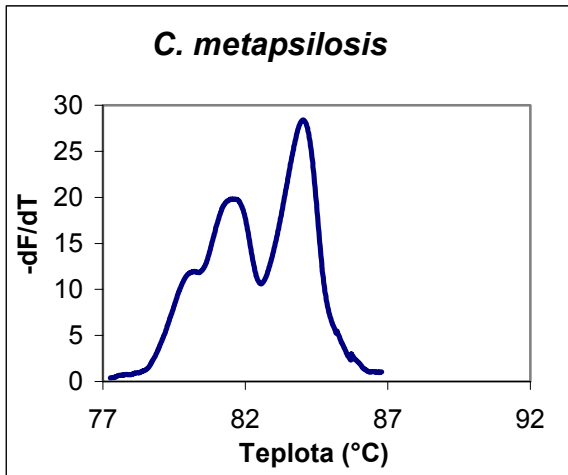
**Příloha E.1** – Průměrné derivované křivky tání jednotlivých druhů/genotypů získané McRAPD analýzou



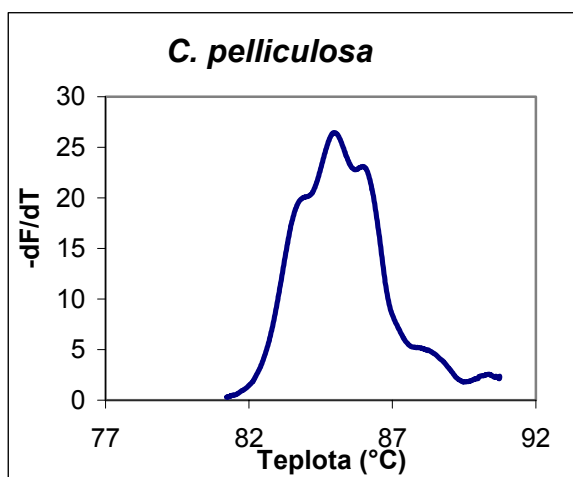
Příloha E.2



Příloha E.3



Příloha E.4



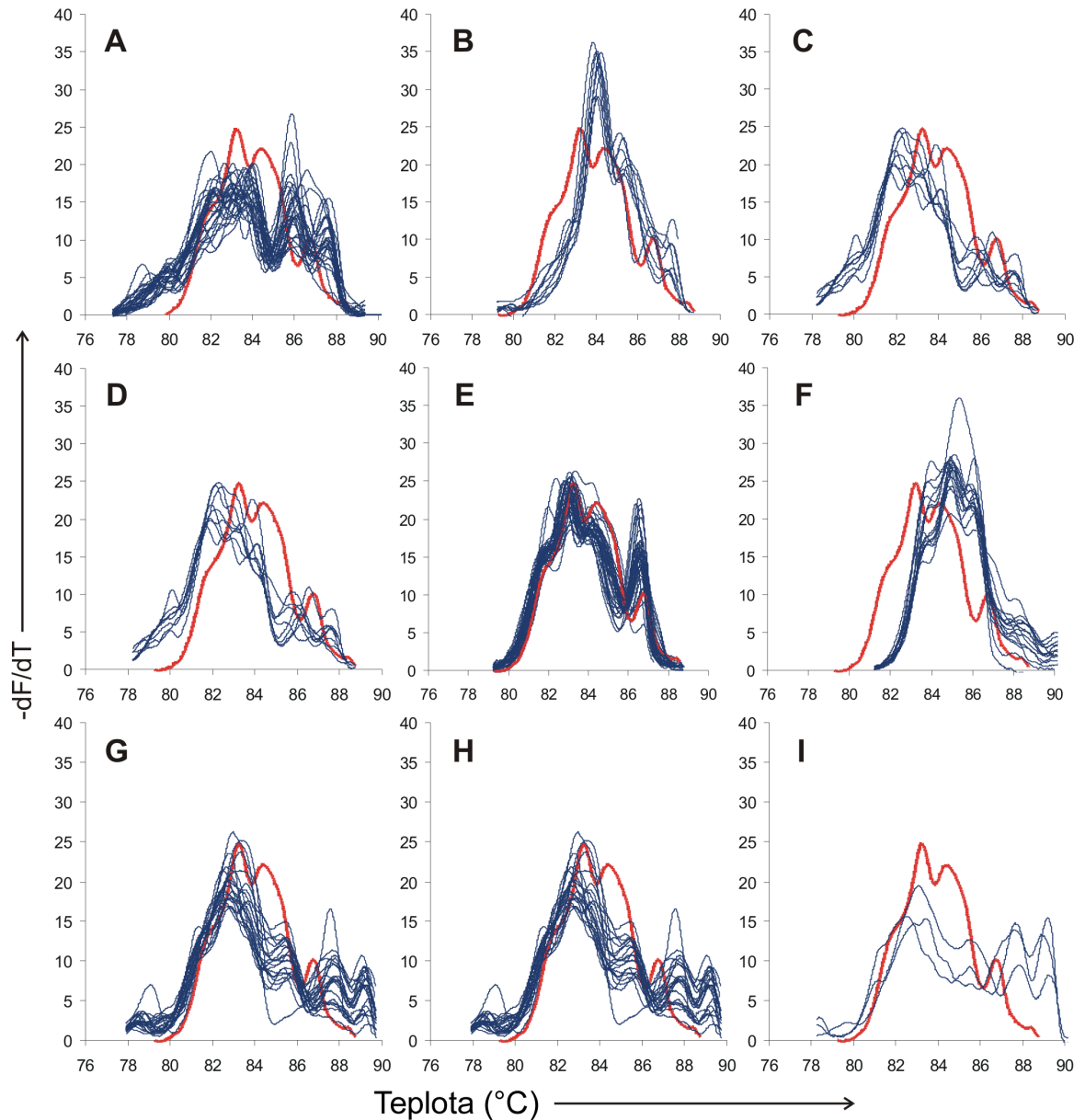
**Příloha F.1** – Průměrné teploty tání odečtené z píků derivovaných křivek tání jednotlivých druhů/genotypů

		Průměrná teplota tání±SD ( °C)		
Druh	Genotyp	Rozhodné píky	Charakteristické píky	Možné píky
<i>Candida albicans</i>	A	86.0±0.22	82.9±0.32 83.9±0.27 87.6±0.11	80.0±0.44 82.0±0.31
	B	84.1±0.10	85.3±0.17 87.6±0.12	79.9±0.06
	C	86.0±0.34	82.0±0.18 82.6±0.30 87.6±0.05	79.8±0.36 83.9±0.29
<i>Candida tropicalis</i>	A	82.7±0.27	85.0±0.33	
	B	78.9±0.24 82.7±0.23 84.8±0.50		
<i>Candida parapsilosis</i>		83.0±0.19 86.6±0.11	84.1±0.19	81.9±0.12
<i>Candida metapsilosis</i>		81.2±0.37 83.8±0.12		79.5±0.17
<i>Candida glabrata</i>		83.7±0.23	82.1±0.26 85.3±0.22	87.1±0.18 89.0±0.36
	A	82.8±0.29	78.6±0.19 85.5±0.19 87.6±0.19 89.2±0.12	
<i>Candida krusei</i>	B	83.0±0.22	78.6±0.16 85.5±0.18	83.9±0.11
	C	82.9±0.25 85.5±0.06 87.7±0.10 89.1±0.21		78.4±0.07
<i>Candida guilliermondii</i>		82.4±0.12 84.7±0.12	85.6±0.11 86.4±0.10	
		85.0±0.16	86.0±0.09	83.8±0.19 88.3±0.24 90.2±0.16
<i>Candida pelliculosa</i>				

**Příloha F.2**

<i>Candida lusitaniae</i>	A	85.4±0.17 86.8±0.15 89.1±0.24		80.4±0.28 82.3±0.19
	B	85.5±0.10 86.9±0.08		80.4±0.23 81.6±0.19 82.4±0.19
	C	80.7±0.13 83.9±0.13 85.7±0.10 87.0±0.09		
	D	85.2±0.06		79.0±0.14 82.8±0.15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A	85.1±0.09		
	B	84.9±0.16		82.8±0.20

## Příloha G – Příklad vizuálního hodnocení podobnosti derivovaných křivek



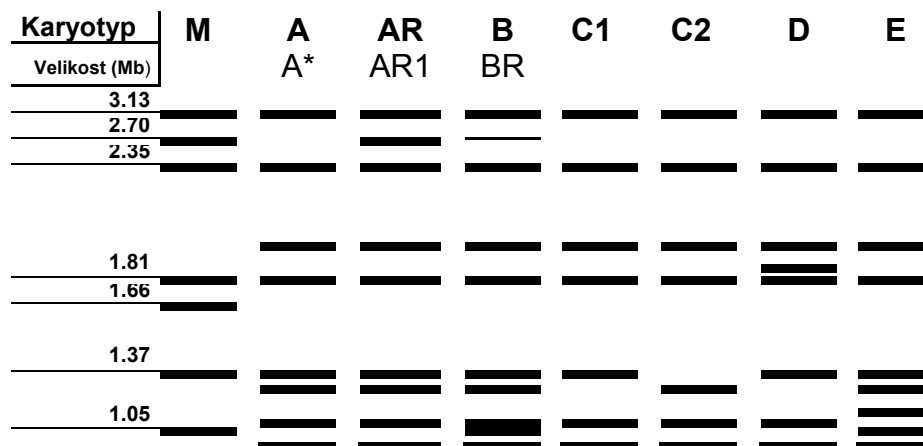
Obr. G-1 – Vizuální hodnocení derivovaných křivek tání pro účely druhové identifikace  
Výnosy derivovaných křivek tání získané se všemi kmeny 9 vybraných druhů/genotypů, které mají ilustrovat princip vizuálního hodnocení. Křivka neznámého testovaného izolátu je vynesena jako tlustší **červená** čára, kdežto křivky ostatních kmenů jsou vyneseny tenkými **modrými** čarami. (A) *C. albicans* genotyp A, (B) *C. albicans* genotyp B, (C) *C. albicans* genotyp C, (D) *C. glabrata*, (E) *C. parapsilosis*, (F) *C. pelliculosa*, (G) *C. krusei* genotyp A, (H) *C. krusei* genotyp B, (I) *C. krusei* genotyp C.

**Příloha H** – Soubor izolátů *C. albicans* pro ověření vnitrodruhové typizační schopnosti metody McRAPD

<b>Datum odběru</b>	<b>Číslo izolátu</b>	<b>Typ materiálu</b>	<b>Karyotyp</b>
28.1.2000	3000	moč-katetr	A
3.2.2000	347	moč- střední proud	A
7.2.2000	760	moč-katetr	A
9.2.2000	1125	špička katetru	C1
14.2.2000	1514	moč- katetr	A
14.2.2000	1527	stolice	D
21.2.2000	2402	moč- katetr	A
4.3.2000	558	hnis	D
10.3.2000	1284	moč- katetr	A
10.4.2000	811	stolice	E
13.4.2000	1161	moč- střední proud	A
18.6.2000	1580	moč- střední proud	A
31.7.2000	2819-1	moč- střední proud	AR
7.8.2000	577	moč- střední proud	B
21.8.2000	2011-1	moč- střední proud	A
4.9.2000	256	moč- střední proud	A
18.9.2000	1509	moč- střední proud	A
2.10.2000	143	moč- střední proud	A
14.10.2000	1224	moč- střední proud	A
3.11.2000	231-2	moč- střední proud	A
24.11.2000	2381	moč- střední proud	A
24.12.2000	2236	stolice	A nebo B
24.12.2000	2290	moč- střední proud	A
20.1.2001	1887-1	moč- střední proud	A
5.2.2001	413-1	moč- střední proud	A
2.4.2001	132-1	moč- střední proud	AR
2.4.2001	132-2	moč- střední proud	C2
18.4.2001	1850-1	moč- střední proud	A
1.5.2001	171	moč- střední proud	A
16.5.2001	1490	moč- střední proud	A
22.5.2001	2120	moč- střední proud	B
10.7.2001	1066-1	moč- střední proud	B
10.7.2001	1066-2	moč- střední proud	A
24.8.2001	2303	moč- střední proud	C1
4.9.2001	334	moč- střední proud	C1
6.9.2001	575	moč- střední proud	C1
20.9.2001	1965	moč- střední proud	C1
11.10.2001	1130	moč- střední proud	A
23.2.2002	2335	moč- střední proud	A



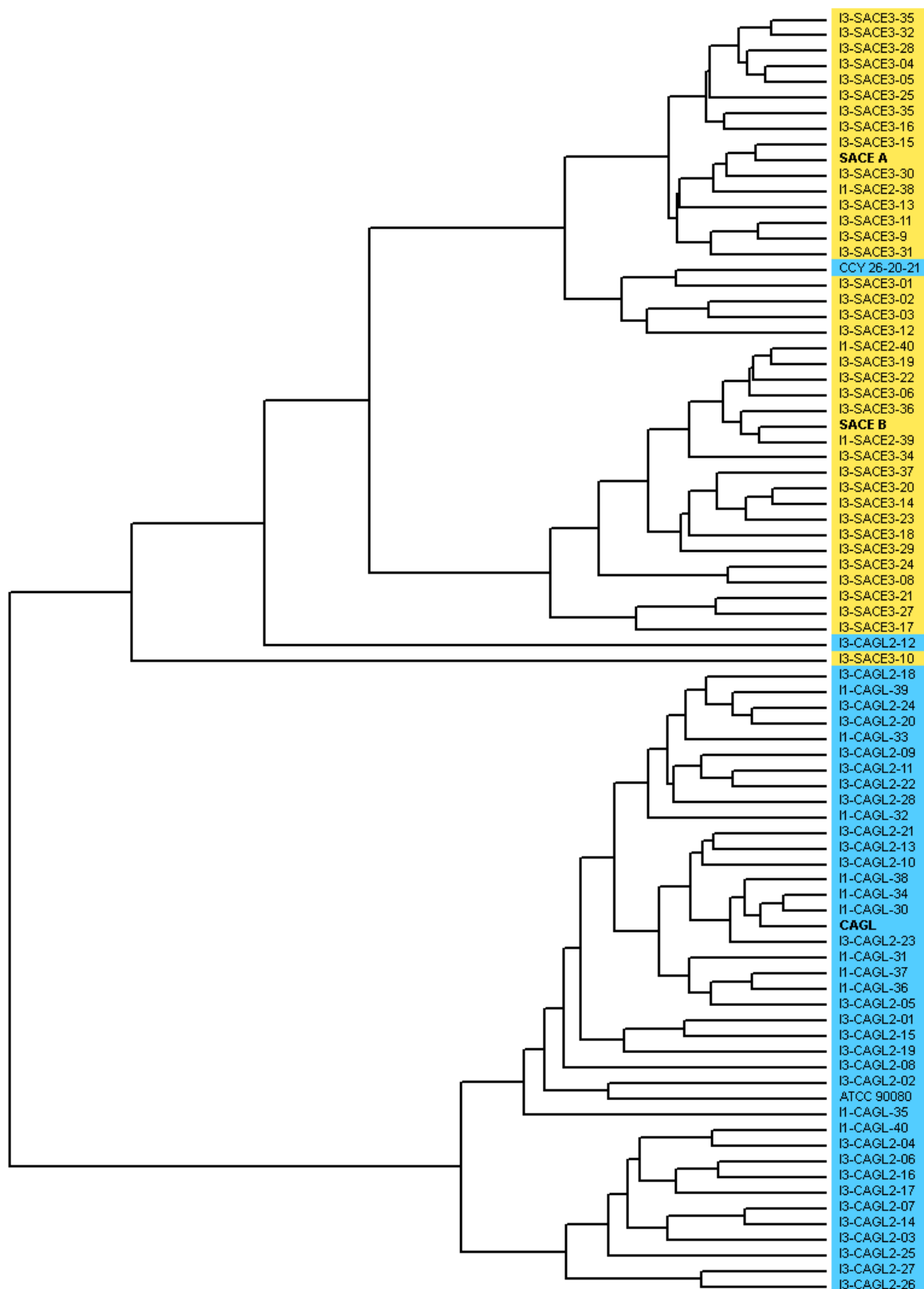
**Příloha I** – Karyotypy souboru izolátů *C. albicans* odebraných od pacienta s VATER syndromem v průběhu dvou let



A\* – nejmenší chromozom je silnější než u karyotypu A

AR1 – jiná poloha R chromozomu než u karyotypu AR

**Příloha J** – Příklad kombinované identifikace automatizovanou metodou McRAPD po předběžné identifikaci na CHROMagaru



Obr. J-1 – Příklad zjednodušené automatizované identifikace po předběžné identifikaci na CHROMagaru s izoláty *S. cerevisiae* (žlutá) a *C. glabrata* (tyrkysová). Dendrogram byl sestaven na základě podobnosti křivek tání získaných metodou McRAPD, byly zařazeny i průměrné křivky tání daných druhů/genotypů (**SACE A**, **SACE B** a **CAGL**).

## Příloha K.1 – Seznam obrázků a tabulek

<b>Obr. 1</b> – Přehled molekulárně-genetických technik detekce a identifikace patogenů .....	21
<b>Obr. 2</b> – Způsoby detekce běžně užívané při real-time PCR.....	26
<b>Obr. 3</b> – Postup jednotlivých kroků metody NASBA .....	29
<b>Obr. 4</b> – Schéma RAPD typizace.....	34
<b>Obr. 5</b> – Prudký pokles fluorescence blízko bodu tání způsobený uvolňováním interkalačního fluorescenčního barviva v důsledku denaturace DNA .....	38
<b>Obr. 6</b> – Velikosti fragmentů DNA v bp u markerů molekulových hmotností .....	47
<b>Obr. 7</b> – Optimalizace koncentrace $Mg^{2+}$ iontů v reakční směsi .....	51
<b>Obr. 8</b> – Optimalizace teploty nasedání primerů.....	53
<b>Obr. 9</b> – Vliv objemu vnášené templátové DNA (0,5 $\mu$ l; 1 $\mu$ l ; 2 $\mu$ l) na výsledné rozložení produktů reakce.....	55
<b>Obr. 10</b> – Vliv objemu vnášené templátové DNA (0,5 $\mu$ l; 1 $\mu$ l ; 2 $\mu$ l) na výsledné rozložení produktů reakce.....	55
<b>Obr. 11</b> – Normalizované (A) a derivované křivky tání (B) a odpovídající fingerprinty pěti různých hrubých lyzátů získaných z nesterilně dlouho kultivovaných kolonií téhož izolátu reprezentujícího jeden ze 4 druhů kvasinek .....	56
<b>Obr. 12</b> – Srovnání výsledků McRAPD dosažených s templátovou DNA získanou pomocí metody hrubých lyzátů kolonií a komerční soupravy .....	57
<b>Obr. 13</b> – Vliv drobných odchylek v reakčních podmínkách mezi jednotlivými běhy na variabilitu výsledků McRAPD a současné ověření krátkodobé stability hrubých lyzátů .....	59
<b>Obr. 14</b> – Ukázka vnitrodruhové variability výsledků McRAPD u nejméně variabilního druhu <i>C. guilliermondii</i> (A, B a C) a u nejvíce variabilního druhu <i>C. krusei</i> (D, E a F) .....	60
<b>Obr. 15</b> – Charakteristický profil McRAPD a odpovídající fingerprint u minoritního (červená křivka tání) a majoritního (černá křivka tání) subtypu <i>C. tropicalis</i> .....	67
<b>Obr. 16</b> – Normalizované (A) a derivované (B) křivky tání získané McRAPD analýzou izolátů <i>C. parapsilosis</i> (červené křivky), <i>C. orthopsilosis</i> (modré křivky) a <i>C. metapsilosis</i> (zelené křivky) .....	70
<b>Obr. 17</b> – Dendrogram odvozený od matice, která vznikla z vypočtených hodnot koeficientů rozdílnosti McRAPD profilů jednotlivých izolátů .....	71
<b>Obr. 18</b> – Dendrogram fingerprintů sestavený v programu GelCompar II metodou UPGMA s koeficienty vypočtenými dle Jaccarda s 1% tolerancí v poloze pruhů .....	71
<b>Obr. 19</b> – Dendrogram RAPD fingerprintů izolátů <i>C. lusitaniae</i> sestavený programem GelCompare II metodou UPGMA s koeficienty vypočtenými dle Jaccarda s 1% tolerancí v poloze pruhů...73	73
<b>Obr. 20</b> – Profily McRAPD jednotlivých izolátů <i>C. lusitaniae</i> .....	73

## Příloha K.2

<b>Obr. 21</b> – Kladogram vytvořený z McRAPD dat izolátů <i>C.lusitaniae</i> na základě numerického vyjádření podobnosti normalizovaných křivek .....	74
<b>Obr. 22</b> – Elektroforeticky rozdělené produkty RAPD vybraných izolátů <i>C. albicans</i> .....	75
<b>Obr. 23</b> – Dendrogram fingerprintů všech izolátů <i>C. albicans</i> sestavený programem GelCompare II metodou UPGMA s koeficienty vypočtenými dle Jaccarda s 1% tolerancí v poloze pruhů...76	
<b>Obr. 24</b> – Dendrogram sestavený programem PhyloDraw na základě numerické podobnosti křivek tání při McRAPD typizaci všech izolátů <i>C. albicans</i> .....	77
<b>Obr. 25</b> – Normalizované křivky tání (A) a odpovídající derivované křivky tání (B) amplifikačních produktů McRAPD izolátů <i>C. albicans</i> .....	78
<b>Tabulka 1</b> – Složení master mixu pro jednu McRAPD reakci.....	46
<b>Tabulka 2</b> – Přehled optimalizovaných parametrů McRAPD protokolu.....	53
<b>Tabulka 3</b> – Souhrn sporných výsledků identifikace.....	62
<b>Tabulka 4</b> – Míra správné identifikace izolátů při použití různých přístupů k interpretaci McRAPD dat ..	64
<b>Tabulka 5</b> – Souhrn nesprávně identifikovaných kmenů na základě vizuálního hodnocení podobnosti derivovaných křivek .....	66
<b>Tabulka 6</b> – Seznam referenčních kmenů <i>C. metapsilosis</i> a <i>C. orthopsilosis</i> a způsob jejich identifikace.....	70
<b>Tabulka 7</b> – Souhrn teplot tání píků souboru izolátů <i>C. lusitaniae</i> získaný při McRAPD typizaci .....	74
<b>Tabulka 8</b> – Souhrn teplot tání píků souboru izolátů <i>C. albicans</i> získaný při McRAPD typizaci .....	78