

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulárně genetická diferenciace lékařsky
významných kvasinek rodu *Pichia***

Diplomová práce

Bc. Michaela Tyčová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením Doc. MUDr. Petra Hamala, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

Podpis.....

Tímto bych chtěla poděkovat především mému školiteli Doc. MUDr. Petru Hamalovi, Ph.D., dále Ing. Lence Postlerové a Mgr. Kristýně Hricové za ochotu, vstřícný přístup, čas a cenné rady, které mi věnovali při zpracovávání mé diplomové práce.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT č. MSM6198959223.

Souhrn

Cílem této práce bylo nalezení spolehlivého způsobu vzájemného rozlišení kvasinek druhů *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*. Za tímto účelem byla testována genetická metoda Melting curve of Random Amplified Polymorphic DNA (McRAPD), založená na rozdílech v teplotě tání produktů amplifikace variabilních oblastí genomu.

Studovaný soubor tvořilo celkem 61 kultur, z toho 47 představovaly klinické izoláty a 14 pocházelo z různých sbírek, včetně typových kmenů všech tří druhů. Izolace DNA byla provedena modifikací tzv. párátkové techniky, popsané a optimalizované Steffanem *et al.* (1997). DNA byla amplifikována v RoboCycleru Gradient 96 (Stratagene) s využitím empiricky optimalizovaného protokolu. Jako porovnávací fenotypová metoda byla použita komerční biochemická souprava ID 32 C (bioMérieux) vyhodnocovaná programem Apiweb (bioMérieux) a doplněná o testy fermentace pěti sacharidů.

Ve studovaném souboru bylo pomocí McRAPD identifikováno 51 kultur *C. fabianii*, po pěti pak bylo zařazeno do druhů *C. pelliculosa*, resp. *C. utilis*. U sbírkových kmenů se genetická identifikace vždy shodovala s jejich původním určením. Naopak rozpor s primárními výsledky fenotypové diference byl zjištěn u naprosté většiny klinických izolátů. Celkem 46 z nich bylo geneticky klasifikováno jako *C. fabianii*, přičemž 37 kultur bylo původně biochemicky určeno jako *C. pelliculosa* a devět jako *C. utilis*. McRAPD přitom prokázala potenciál pro confirmaci výsledků fenotypových metod, neboť vizuální analýza křivek tání umožňovala většinou jednoznačnou druhovou identifikaci izolátů.

Příčinou neshod mezi výsledky genetické klasifikace a biochemické identifikace u studovaného souboru klinických izolátů je absence *C. fabianii* v databázi programu Apiweb. *C. pelliculosa* a *C. utilis* však do ní zařazeny jsou, proto je možné tyto druhy uvedeným postupem s velkou pravděpodobností správně určit. Naopak spolehlivý nástroj identifikace *C. fabianii* představují v současné době pouze genetické metody, které jsou navíc rychlejší a přesnější.

Z výsledků této práce dále vyplývá, že McRAPD je velmi vhodnou metodou pro exaktní diferenciaci *C. fabianii*, *C. pelliculosa* a *C. utilis*. Současně bylo zjištěno, že se *C. fabianii* pravděpodobně vyskytuje v klinickém materiálu s výrazně vyšší

frekvencí než zbylé dva druhy. Proto je nanejvýš žádoucí ji co nejdříve zařadit do databází komerčních biochemických identifikačních souprav.

Summary

The aim of this study was to find a reliable way of differentiation between the yeast species *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* and *Candida utilis*. For this purpose, a genetic method called melting curve of random amplified polymorphic DNA (McRAPD) was tested, which is based on differences in melting temperatures of amplification products of variable areas of the genome.

The studied group consisted of 61 cultures, of which 47 represented clinical isolates and 14 were from various collections, including type strains of all three species. DNA extraction was performed by modifying the so-called toothpick technique described and optimized by Steffan *et al.* (1997). DNA was amplified in RoboCycler Gradient 96 (Stratagene) using an empirically optimized protocol. As a comparative phenotypic method, the ID 32 C commercial biochemical kit (bioMérieux) was used, assessed by the Apiweb software (bioMérieux) and supplemented by five carbohydrate fermentation tests.

Using McRAPD, 51 cultures were identified as *C. fabianii*, the remaining 10 were classified as *C. pelliculosa* (n=5) and *C. utilis* (n=5). In the collection strains, genetic identification always coincided with their original determination. Conversely, the vast majority of clinical isolates were found to be different from the primary results of phenotypic differentiation. A total of 46 of them were genetically classified as *C. fabianii*, with 37 cultures being biochemically identified as *C. pelliculosa* and 9 as *C. utilis*. McRAPD has demonstrated a potential to confirm the results of phenotypic methods since the visual analysis of melting curves allowed accurate species identification of the majority of isolates.

The disagreement between the results of genetic and biochemical identification in the studied group of clinical isolates originated from the absence of *C. fabianii* in the Apiweb software database. However, this contains both *C. pelliculosa* and *C. utilis*. Therefore, it was possible to identify these species correctly using the procedure. Conversely, genetic methods are currently the only reliable tool for identification of *C. fabianii* isolates. Moreover, they are faster and more accurate.

Further, the results of our study show that McRAPD is a very suitable method for accurate differentiation between *C. fabianii*, *C. pelliculosa* and *C. utilis*. It was also found that *C. fabianii* is likely to be significantly more prevalent in clinical material

than the other two species studied. Therefore, it is highly desirable to incorporate this species into databases of commercial biochemical identification systems as soon as possible.

Obsah

1 Úvod	10
1.1 Vymezení a taxonomie kvasinek	10
1.2 Kvasinky významné v lékařství	10
2 Současný stav řešené problematiky	12
2.1 Etiologie kvasinkových infekcí z taxonomického hlediska	12
2.2 Identifikace kvasinek v diagnostické praxi	12
2.2.1 Fenotypové metody identifikace	13
2.2.2 Genetické metody identifikace	16
2.2.2.1 Identifikace analýzou RNA	17
2.2.2.2 Identifikace analýzou DNA bez amplifikace	18
2.2.2.3 Identifikace analýzou DNA s amplifikací	18
3 Cíl práce	26
4 Materiál a metody	27
4.1 Chemikálie, přístroje, materiál	27
4.1.1 Chemikálie	27
4.1.2 Roztoky	28
4.1.3 Biochemická identifikace kvasinek	28
4.1.4 Kultivační půdy	29
4.1.5 Přístroje a zařízení	29
4.1.6 Počítačové programy	29
4.1.7 Kultury kvasinek	29
4.2 Metodický postup	31
4.2.1 Izolace DNA	31
4.2.2 Provedení McRAPD	32
4.2.3 Analýza dat	32
4.2.4 Fenotypová identifikace	33

5 Výsledky	35
5.1 Genetická diferenciace kvasinek	35
5.2 Biochemická identifikace kvasinek	42
6 Diskuse	44
6.1 Kazuistiky mykóz způsobených druhy <i>Candida fabianii</i> , <i>Candida pelliculosa</i> a <i>Candida utilis</i>	44
6.1.1 Mykotické infekce způsobené <i>C. fabianii</i>	44
6.1.2 Mykotické infekce způsobené <i>C. pelliculosa</i>	45
6.1.3 Mykotické infekce způsobené <i>C. utilis</i>	46
6.1.4 Způsoby rozlišení <i>C. fabianii</i> , <i>C. pelliculosa</i> a <i>C. utilis</i>	47
6.2 Diferenciace kvasinkových druhů pomocí McRAPD	47
6.2.1 Hodnocení RAPD	48
6.2.2 Příklady využití RAPD v klinických studiích	48
6.2.3 Možnosti a limity McRAPD	50
6.2.4 Porovnání identifikace McRAPD a ID 32 C	51
7 Závěry	52
8 Seznam použitých zkratk	53
9 Použitá literatura	54

1 Úvod

1.1 Vymezení a taxonomie kvasinek

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy patřící do říše *Fungi* (houby), oddělení *Eumycota* („pravé“ houby). Kurtzman *et Fell* (1998) ve své taxonomické studii uvádějí, že v rámci více než 90 rodů je popsáno téměř 700 druhů. Podle Fragnera (1992) dosahuje počet druhů těchto mikromycet vyskytujících se u nás necelou polovinu z jejich celkového počtu.

Na základě schopnosti reprodukce sexuálním způsobem jsou kvasinky děleny na dvě skupiny. Tzv. pravé kvasinky využívají pohlavního způsobu rozmnožování a tvoří za vhodných podmínek asko-, resp. bazidiospory. Naopak kvasinkovité mikroorganismy (imperfektní kvasinky) se množí pouze nepohlavně, tvorba asků ani bazidií u nich nebyla pozorována (McGinnis, 1980). Taxonomická nomenklatura upřednostňuje název teleomorfy (pohlavní stádium), pokud je známa, před jménem anamorfy (nepohlavní stádium). V klinické praxi se naopak obvykle užívá název anamorfy, protože teleomorfní stádia byla většinou objevena později a zdravotničtí pracovníci v té době již byli zvyklí na název nepohlavního stádia. Protože je tato práce zaměřena na problematiku lékařské mykologie, jsou v dalším textu používány v souladu s klinickým názvoslovím převážně názvy anamorf.

1.2 Kvasinky významné v lékařství

Ve vztahu k člověku mohou být kvasinky komenzály, symbionty nebo parazity. Bývají běžnou součástí normální mikroflóry kůže a sliznic (Nucci *et Anaissie*, 2001). Kolonizují dutinu ústní více než poloviny obyvatelstva bez projevů manifestního onemocnění.

Patogenita kvasinek se nejčastěji projevuje formou invaze do hlubších vrstev tkání, klinicky jsou tyto formy onemocnění označovány jako mykózy. Mohou být povrchové, postihující kůži a sliznice a systémové, kdy jsou napadeny různé vnitřní orgány, což bezprostředně ohrožuje život pacientů. Onemocnění vyvolaná kvasinkami mají charakter oportunních infekcí, které podle Sandvena (2000) vznikají především u osob s poruchami funkce imunitního systému. Pfaller *et Diekema* (2007) ve své přehledové

studii zmiňují, že morbidita a mortalita systémových kvasinkových mykóz je značná, proto se staly závažným zdravotním problémem.

Ahearn (1998) uvádí asi 30 druhů kvasinek, kolonizujících lidskou populaci, z nich jsou dvě třetiny považovány za potenciální patogeny. Největší počet náleží do anamorfního rodu *Candida*, jehož zástupci způsobují 66 - 80 % všech houbových infekcí (Dembry *et al.*, 1994; Fanello *et al.*, 2006). Přestože bylo popsáno více než 200 druhů kandid, způsobuje podle Pfallera *et Diekemy* (2007) lidská onemocnění (kandidózy) pouze malý počet z nich. Řada nezávislých studií (Fridkin, 2005; Pfaller *et Diekema*, 2002; Trick *et al.*, 2002; Warnock, 2007) uvádí, že celosvětově je více než 95 % všech kvasinkových infekcí přičítáno pěti druhům: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* a *Candida krusei*, navíc první z nich mezi nimi výrazně dominuje.

Postupně byla vyvinuta celá řada metod identifikace patogenních kvasinek. Tradiční fenotypové, založené na asimilaci a fermentaci zdrojů uhlíku a dusíku, jsou časově náročné a mnohdy nevedou k jednoznačným výsledkům. Některé druhy kvasinek se navíc vyznačují vysokým stupněm morfologické a biochemické podobnosti. Příkladem je *Candida albicans* a *Candida dubliniensis*, *Candida inconspicua* bývá zase zaměňována za *Candida norvegensis*. Nedávno popsané druhy *Candida orthopsilosis* a *Candida metapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005) jsou pomocí konvenčních fenotypových technik obtížně odlišitelné od *Candida parapsilosis*. Neméně komplikovaná je diferenciací *Candida pelliculosa*, *Candida utilis* a *Candida fabianii*.

Později se významným nástrojem mykologické laboratorní diagnostiky staly metody genetické identifikace patogenních kvasinek. Ve srovnání s fenotypovými přístupy umožňují spolehlivější a přesnější mezidruhovou diferenciaci v důsledku jejich zaměření na relativně stálé genetické znaky. Ačkoli existuje široké spektrum různých technik, v současné době bývají nejčastěji aplikovány různé modifikace polymerázové řetězové reakce (PCR). Mezi její hojně využívané varianty patří náhodná amplifikace polymorfni DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD). Velký potenciál má zejména přístup, využívající rozdíly v teplotě tání produktů PCR (Melting curve of Random Amplified Polymorphic DNA, McRAPD), který byl vyvinut pro rychlou a precizní identifikaci patogenních kvasinek Plachým *et al.* (2005). Výhodou této metody je rychlost získání výsledků, jednoduché provedení, ekonomická nenáročnost, univerzální využití a potenciál pro automatizaci.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Etiologie kvasinkových infekcí z taxonomického hlediska

Kromě již zmíněných druhů imperfektního rodu *Candida* způsobuje mykotické infekce řada dalších, z nichž některé do něj původně patřily, ale na základě průkazu teleomorfního stádia byly přeřazeny do některého z perfektních rodů. Nejznámějšími příklady z oblasti humánní medicíny je druh *Candida krusei*, jehož současný taxonomický název je *Issatchenkia orientalis*, *Candida lusitaniae* byla přeřazena do rodu *Clavispora* (*C. lusitaniae*). Také mnoho dalších kandid je dnes anamorfními stádii askomycetárních rodů kvasinek, například *Pichia* (např. *P. anomala* - *Candida pelliculosa*, *P. fabianii* - *Candida fabianii*, *P. jadinii* - *Candida utilis*, *P. guilliermondii* - *Candida guilliermondii*, *P. norvegensis* - *Candida norvegensis*, *P. membranifaciens* - *Candida valida*), *Kluyveromyces* (*K. marxianus* - *Candida kefyri*, *K. lactis* var. *lactis* - *Candida sphaerica*), *Debaryomyces* (*D. hansenii* - *Candida famata*), *Saccharomyces* (*S. exiguus* - *Candida holmii*), *Torulaspora* (*T. delbrueckii* - *Candida colliculosa*), *Metchnikowia* (*M. pulcherrima* - *Candida pulcherrima*) nebo *Yarrowia* (*Y. lipolytica* - *Candida lipolytica*) (Kurtzman *et al.*, 1998).

Povrchové i systémové infekce mohou způsobovat také zástupci jiných rodů, patřících mezi askomycety, bazidiomycety nebo imperfektní kvasinky. Mezi nejznámější z nich patří rody *Dipodascus*, *Galactomyces*, *Williopsis*, *Filobasidiella*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* a *Malassezia*. Klasifikace se mimoto dynamicky vyvíjí, vznikají přitom další rody jako *Lindnera* (např. *L. fabianii* - *P. fabianii*) nebo *Wickerhamomyces* (např. *W. anomalus* - *P. anomala*) (Kurtzman *et al.*, 2008). Taxonomická klasifikace, založená na exaktní diferenciaci kmenů pomocí řady jejich charakteristik (morfologie, biochemie, analýzy genetického materiálu), je časově i materiálově velmi náročná a je proto vyhrazena specializovaným pracovištím, většinou mezinárodním sbírkám kultur.

2.2 Identifikace kvasinek v diagnostické praxi

V rutinní diagnostické praxi laboratoří lékařské mykologie se používají pro určování kvasinek zjednodušené postupy, jejichž hlavním cílem je z důvodu časného zahájení léčby rychlost a nikoli absolutní přesnost. Identifikace kvasinkových

izolátů je zde důležitá z klinického i epidemiologického hlediska. Některé početněji izolované druhy jsou totiž známé svou rezistencí k antimykotikům, což může být důvodem selhání běžné léčebné strategie. Platí to především pro *C. krusei* a flukonazol, ke kterému je primárně rezistentní. Významně vyšší hodnoty minimálních inhibičních koncentrací azolových antimykotik jsou zaznamenávány u mnoha kmenů *C. glabrata*. V některých případech mykóz způsobených *C. lusitaniae* může být neúspěšná léčba amfotericinem B (Atkinson *et al.*, 2008). Epidemiologický význam identifikace kvasinek spočívá v tom, že jde o první krok při hledání zdroje nozokomiálních infekcí exogenního původu.

Postupně byla vyvinuta řada různých technik pro určování kvasinek, některé z nich se dočkaly podoby komerčních diagnostických souprav. Ve shodě s mnohými autory (Pincus *et al.*, 2007; Reiss *et al.*, 1998; Trtková *et Raclavský*, 2006) je lze rozdělit na dvě skupiny, fenotypové a genetické.

2.2.1 Fenotypové metody identifikace

Fenotypové metody využívají rozdíly v morfologii, biochemické aktivitě nebo antigenním složení kvasinek.

Chromogenní kultivační půdy jsou založeny na utilizaci různých chromogenních substrátů jednotlivými druhy kvasinek, což způsobuje rozdíly ve zbarvení kolonií. Proto umožňují jejich předběžnou identifikaci a snadný průkaz směsných kultur (Freydiere *et al.*, 2001). První spolehlivá diferenciací média vyvinul Rambach (1995), komerčně dostupná půda pro orientační určování klinicky nejvýznamnějších druhů kandid je vyráběna pod názvem **CHROMagar Candida**. Jsou v ní přítomny dva chromogenní substráty štěpitelné enzymy β -N-acetylhexosaminidázou a fosfatázou. Může být využita pro předběžnou identifikaci *C. albicans* (žlutozelené až modrozelené kolonie), *C. tropicalis* (tmavě modré až modrošedé kolonie, často obklopené tmavou zónou), *C. krusei* (světle růžové až purpurové, matné, nepravidelné kolonie) a *C. glabrata* (růžové, vysoce lesklé, okrouhlé kolonie). Momani (2000) ve své studii potvrdil, že CHROMagar Candida umožňuje významně rychlejší určení zmíněných druhů kandid v porovnání s metodami běžně používanými v mykologické laboratoři, navíc za přijatelnou cenu. Podobné chromogenní půdy jiných výrobců jsou určeny pro identifikaci pouze *C. albicans* (např. **ChromID Candida** [bioMérieux])

nebo i dalších častěji zachycovaných druhů (např. **CandiSelect 4** [BioRad Laboratories], **Brilliance Candida Agar** [Thermo Fischer Scientific, Oxoid Products]).

Pro cílenou identifikaci *C. albicans*, která je nejčastější příčinou mykotických infekcí, byly zavedeny **skrínigové metody**. Patří mezi ně tzv. **test klíčících vláken (germ tubes)**, vyvinutý Taschdjianem *et al.* (1960). Další možností je podle Pincuse *et al.* (2007) **mikroskopický nález chlamydospor**, nejčastěji na rýžovém nebo kukuřičném agaru. V podobě komerčních produktů (např. **BactiCard Candida** [ThermoFischer Scientific, Remel Products]) jsou k dispozici **enzymatické testy**, identifikující *C. albicans* průkazem L-prolin-aminopeptidázy a β -galaktosidázy (Heelan *et al.*, 1996). Stockman *et Roberts* (1985) vytvořili analogickou metodu pro rychlé určení dalšího klinicky významného druhu, *C. glabrata*, založenou na detekci enzymu trehalázy. Freydiere *et al.* (2001) a ve své přehledové práci nezávisle i Pincus *et al.* (2007) zmiňují několik jejích variant, komerčně je dostupná pod názvem **Glabrata RTT** (Fumouze Diagnostics). Mezi skrínigové způsoby identifikace některých druhů kandid patří i **sérologické testy**, založené na principu latexové aglutinace (Freydiere *et al.*, 2001). V současné době jsou k dispozici pro rychlé určení *C. albicans*, resp. *C. krusei* komerční produkty **Bichro-Latex Albicans** a **Krusei Color**, k rozlišení *C. albicans* a *C. dubliniensis* **Bichro-Dubli** (vše Fumouze Diagnostics).

Klasickým způsobem podrobné biochemické identifikace kvasinek jsou **testy asimilace a fermentace zdrojů uhlíku**, případně **dusíku**. První skupina využívá aerobní utilizace zmíněných substrátů, jedná se o tzv. **auxanogramy**. Patří k nim **Wickerhamova bujónová technika** (Wickerham *et Burton*, 1948) a praktičtější auxanografická metoda (**Dye Pour-Plate Auxanogram, DPPA**) vyvinutá Landem *et al.* (1975). Fermentace sacharidů je naopak proces anaerobní, proto je utilizace prokazována vytvořením bubliny (tj. akumulací oxidu uhličitého) v plynovce, což je principem testů, které se nazývají **zymogramy**.

Z uvedených katabolických reakcí vycházejí i **komerční soupravy** na identifikaci kvasinek, které jsou běžnou součástí diagnostiky v laboratořích lékařské mykologie. Naprostá většina z nich je založena na testování schopnosti asimilace různých zdrojů uhlíku.

Soupravy, které vyžadují ruční provedení a jejichž výsledky se posuzují prostým okem, představují skupinu tzv. **manuálních systémů** (Pincus *et al.*, 2007). Identifikace se obvykle provádí numericky, konkrétně pomocí tzv. oktalového kódování. Příkladem uvedeného typu souprav je **API 20 C AUX** (bioMérieux), která obsahuje 19 zdrojů

uhlíku. Testy se hodnotí turbidimetricky, tj. porovnáváním stupně zákalu s negativní kontrolou. Databáze sestává celkem ze 37 druhů kvasinek. Další, v našich laboratořích často používanou soupravou, je **Auxacolor** (Bio-Rad Laboratories), obsahující 15 zkoušek, z nich 13 prokazuje asimilaci sacharidů a alkoholů, zbylé dvě citlivost k cykloheximidu a přítomnost fenoloxidázy. Na rozdíl od API 20 C AUX je vyhodnocení kolorimetrické, tj. na základě změny barvy média. Pomocí kódových profilů lze rozlišit celkem 28 druhů kvasinek. Barevné reakce využívá i řada dalších souprav: **API Candida** (bioMérieux), kterou je možno pomocí 12 testů identifikovat 13 druhů kvasinek, **Fungichrom I** (International Microbio) složená z 15 reakcí s potenciálem určit 24 druhů nebo **RapID Yeast Plus** (ThermoFischer Scientific, Remel Products) umožňující s využitím 15 substrátů zařadit izoláty do 41 druhů (Freydiere *et al.*, 2001; Lin *et Fung*, 1987; Pincus *et al.*, 2007).

Druhou skupinu tvoří **automatizované**, resp. **poloautomatizované systémy**. Vyhodnocení testů, případně i technická příprava souprav je prováděna pomocí přístrojů. Nejobsáhlejší databází disponuje produkt **Biolog YT MicroPlate** (Biolog). S využitím 94 biochemických testů v mikrotitrační destičce a speciálního počítačového programu je možno identifikovat 267 druhů kvasinek z 53 rodů. Souprava **ID 32 C** (bioMérieux), založená podobně jako API 20 C AUX na turbidimetrickém principu odečítání testů, využívá 31 substrátů, z toho 29 pro asimilaci (sacharidy, organické kyseliny a aminokyseliny), zbylé dva prokazují hydrolýzu eskulinu a citlivost k cykloheximidu. Výrobek je primárně určen k automatické inokulaci a přístrojovému vyhodnocení, je však možno přípravu provést i manuálně a výsledek vyhodnotit prostým okem. Interpretace se ve zmíněném případě provádí pomocí oktalového kódování s využitím databáze programu Apiweb (BioMérieux) zahrnující celkem 64 kvasinkových druhů. Další často používaný, zcela automatizovaný kolorimetrický panel, **VITEK 2 YST** (bioMérieux), obsahuje na plastové kartě jamky se čtyřmi aminopeptidázovými a třemi glykosidázovými reakcemi, ureázovým testem, zkouškou citlivosti k cykloheximidu a průkazem hydrolýzy eskulinu, utilizací 25 sacharidů, KNO₃, dvou dalších zdrojů dusíku a devíti organických kyselin. Databáze obsahuje celkem 52 kvasinkových druhů. Podobná kolorimetrická souprava, **MicroScan Rapid Yeast ID** (Siemens Healthcare), umožňuje během čtyř hodin identifikovat 38 druhů kvasinek. Poloautomatizovaný německý produkt **Micronaut-Candida** (Merlin Diagnostika) je schopen pomocí kombinace 44 turbidimetrických a barevných biochemických reakcí určit 32 druhů.

Za jednu z nejspolehlivějších identifikačních souprav z hlediska hodnocení výsledků, navíc s obsáhlou databází druhů, je považována ID 32 C, což bylo dokumentováno srovnávacími studii. Například Bruun *et al.* (1995) pomocí zmíněného produktu, asimilačních a fermentačních testů a mikroskopických nálezů chlamydospor na rýžovém nebo kukuřičném agaru, porovnávali přesnost určení 113 klinických izolátů kvasinek, z nichž 10 druhů patřilo do rodu *Candida*. Vizuálním vyhodnocením po 72 h bylo pomocí identifikační tabulky správně určeno 98 % izolátů, s využitím databáze pak 91 %. Automatická druhová diferenciaci v přístroji ATB reader, provedená po 48 a 72 h, byla úspěšná u 87, resp. 86 % kultur. Gutierrez *et al.* (1994) porovnávali spolehlivost tří souprav, ID 32 C, VITEK 2 YST a API 20 C AUX, při identifikaci 100 klinických izolátů sedmi druhů kandid a tří dalších rodů kvasinek. Soupravy správně určily 97, 98, resp. 100 % kultur. Fricker-Hidalgo *et al.* (1996) se zaměřili na porovnání ID 32 C s API Candida. Studovaný soubor tvořilo 619 kultur 17 druhů kandid a čtyř jiných rodů kvasinkovitých mikroorganismů, z nichž bylo 284 klinických izolátů a 335 sbírkových kmenů. Pomocí API Candida bylo správně identifikováno 97,4 % kultur (biochemicky a morfologicky), resp. 75,2 % (pouze biochemicky). Šest druhů nebylo možno určit, protože nebyly zařazeny v databázi soupravy. Autoři neuvedli úspěšnost diferenciaci pomocí ID 32 C, pouze konstatovali, že API Candida je jednodušší na provedení, levnější a výsledky rychleji dostupné. Ramani *et al.* (1998) porovnávali spolehlivost identifikace soupravami ID 32 C a API 20 C AUX na souboru 243 klinických izolátů 18 druhů kandid a dalších devíti rodů kvasinkovitých mikroorganismů, z nich 123 zahrnovalo běžné druhy a 120 vzácné. Celý testovaný soubor kvasinek byl získán od pacientů, hospitalizovaných v nemocnicích v USA. ID 32 C správně určila 92 % obvyklých a 85 % méně známých druhů, API 20 C AUX 97, resp. 88 %. Nižší úspěšnost první soupravy však mohla být ovlivněna geografickým původem kultur, neboť databáze ID 32 C byla vytvořena pomocí evropských izolátů, API 20 C AUX naopak využila výhradně americké.

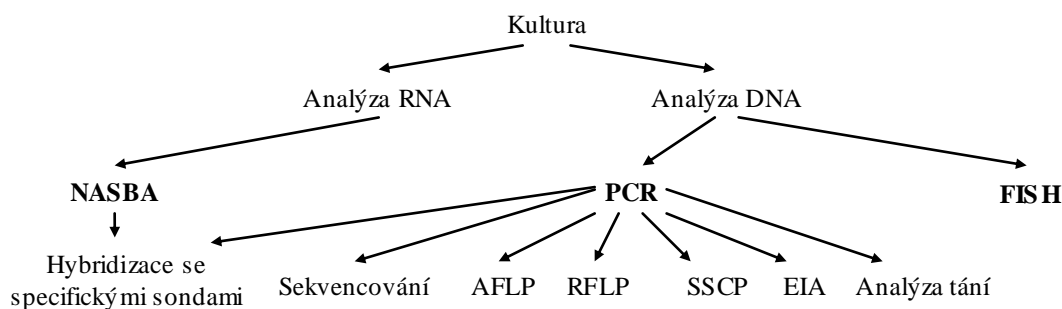
2.2.2 Genetické metody identifikace

Genetické metody jsou stále významnějším nástrojem mykologické laboratorní diagnostiky. Kromě identifikace kvasinek i vláknitých hub umožňují detekci jejich nukleových kyselin v klinických vzorcích a typizaci, tj. diferenciaci kmenů v rámci druhu (Hamal, 2007). K jejich výhodám v porovnání s fenotypovými přístupy

patří vyšší rozlišovací schopnost, rychlost a reprodukovatelnost (Pincus *et al.*, 2007; Sullivan *et al.*, 1996; Trtková *et Raclavský*, 2006).

Genetickou identifikaci je možné provést samostatně u vypěstovaných kultur, často však bezprostředně navazuje na detekci nukleových kyselin v klinickém materiálu. Zatímco při záchytu ve vzorcích je vyžadována především rychlost a vysoká citlivost, při druhovém či rodovém určování etiologického agens je nejdůležitější přesnost. Pokud tedy identifikace navazuje na detekci, měly by být splněny všechny uvedené požadavky. V rámci genetické diferenciacie kvasinek existuje široké spektrum různých metod, žádná z nich však dosud nebyla akceptována jako standardní. Nejvýznamnější jsou uvedeny ve schématu 1.

Schéma 1. Přehled způsobů genetické identifikace kvasinek^a



^a Upraveno podle Trtkové *et Raclavského* (2006)

AFLP - délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů; **EIA** - enzymová imunoanalýza; **FISH** - fluorescenční *in situ* hybridizace; **NASBA** - amplifikace specifických sekvencí RNA; **PCR** - polymerázová řetězová reakce; **RFLP** - délkový polymorfismus restrikčních fragmentů; **SSCP** - konformační polymorfismus jednovláknové DNA

2.2.2.1 Identifikace analýzou RNA

NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) je velice citlivá technika **cyklického množení specifických sekvencí RNA**. Během amplifikace využívá aktivity tří enzymů, AMV reverzní transkriptázy (z viru ptačí myeloblastózy, tj. *Avian Myeloblastosis Virus*), RNázy H a T7 RNA polymerázy. Na specifický úsek izolované RNA nejprve nasedne přímý (forward) primer. Pomocí enzymu reverzní transkriptázy je tato část zkopírována do formy jednoho komplementárního vlákna DNA. RNáza H

následně odbourá RNA templátové vlákno a uvolní tak místo pro vazbu druhého specifického zpětného (reverse) primeru. Poté vzniká prodloužením primeru reverzní transkriptázou plnohodnotná dvojitá vlákenná molekula DNA (tzv. komplementární DNA, cDNA). T7 RNA polymeráza rozpozná promotor uvnitř sekvence forward primeru a transkribuje cDNA do vlákna RNA o výchozí sekvenci. Toto nové vlákno vstupuje do dalšího cyklu. Postupně tak dochází k amplifikaci zvolených specifických sekvencí RNA (Compton, 1991).

Z prací Hamala (2007), nezávisle i Trtkové *et Raclavského* (2006) pro identifikaci kvasinek vyplývá, že hlavní výhodou NASBA je izotermie procesu amplifikace, čímž odpadá použití termocykleru. Naopak hlavním nedostatkem, jež brání širšímu použití metody v praxi, je vysoká cena reakční směsi tří uvedených enzymů. Popsanou techniku využili např. Loeffler *et al.* (2003) k identifikaci šesti druhů kandid pomocí komerční soupravy NASBA Nuclisens Basic Kit.

2.2.2.2 Identifikace analýzou DNA bez amplifikace

Metodou **fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)** je identifikována kvasinková DNA přímou hybridizací s druhově specifickými sondami bez předchozí amplifikace. Buňky jsou fixovány na podložním sklíčku, DNA je poté denaturována na jednovláknové molekuly. Na jejich komplementární sekvence nukleotidů se následně navazují oligonukleotidové sondy. Jsou jimi různě dlouhá vlákna DNA nebo RNA o známých sekvencích, značená fluorochromem. Dnes jsou využívány nové, vysoce afinitní, tzv. PNA sondy (Peptide Nucleic Acid), což jsou kombinované molekuly peptidu a nukleové kyseliny. Preparáty jsou posléze vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu, místa vazby svítí příslušnou barvou (Hamař, 2007; Trtková *et Raclavský*, 2006).

Podle Trtkové *et Raclavského* (2006) je PNA FISH vhodná pro automatizaci, neboť využívá jednoduchý technický protokol bez nutnosti izolace DNA. Metodu využili např. Wilson *et al.* (2005) k identifikaci *C. albicans* v hemokulturách. Hlavní výhodou bylo podle autorů provedení celé metodiky během 2,5 h za spotřeby pouhých 10 µl média a bez nutnosti dalších subkultivačních kroků.

2.2.2.3 Identifikace analýzou DNA s amplifikací

Při identifikaci kvasinek bývají v současné době používány především různé modifikace PCR. V podstatě se jedná o cyklickou amplifikaci specifického úseku

dvojláknové DNA (double-stranded DNA, dsDNA), ohraničeného dvojicí primerů, prostřednictvím termostabilního enzymu DNA polymerázy. K přednostem jmenované techniky patří jednoduché provedení (automatizace v termocykleru), rychlost získání výsledků a vysoká citlivost.

Výběr primerů

Existují dvě možné strategie volby cílových sekvencí, jež budou pomocí PCR amplifikovány.

První přístup si jako místo navázání primerů vybírá druhově specifické sekvence v kvasinkovém genomu. Jedná se především o geny vyskytující se zde v jedné kopii, například pro cytochrom P-450 lanosterol- α -demetylázu, aktin nebo heat shock protein 90 (Burgener-Kairuz *et al.*, 1994; Crampin *et al.*, 1993; Kan, 1993). Přitom je identifikován pouze jeden druh kvasinky.

Cílem cyklického množení však mohou být naopak univerzální panfungální vysoce konzervované oblasti genomu, vyskytující se v něm ve velkém počtu kopií. V takovém případě je pro druhovou identifikaci nezbytná analýza amplifikovaného produktu, postupy jsou popsány dále. Mezi zmíněné sekvence patří zejména geny pro ribozomální RNA (rRNA), nacházející se v genomu hub v počtu 50 - 100 kopií. Zatímco geny, kódující podjednotky rRNA (18S, 5,8S a 28S), jsou tvořeny konzervovanými sekvencemi, vnitřní transkribované prostory (internal transcribed spacer, ITS) ITS1 a ITS2 obsahují také oblasti vysoce variabilní, představující potenciál pro typizaci kmenů, resp. identifikaci druhů (Reiss *et al.*, 1998).

Varianty PCR

Kromě klasické jednokolové PCR byly vyvinuty varianty, zvyšující její citlivost a specifitu.

První z nich je tzv. **nested PCR**, označována též jako PCR odstupňovaná nebo využívající vnějších a vnitřních primerů. Amplifikace se provádí ve dvou kolech. V prvním je cyklicky množen vybraný úsek DNA za použití páru tzv. vnějších primerů. Následně je produkt podroben amplifikaci s novou dvojicí tzv. vnitřních primerů, specifických pro vnitřní část sekvence, jež byla získána při první PCR. Finální produkt je detekován elektroforeticky. Hamal (2007) zmiňuje, že není-li možné navrhnout pro druhý krok oba primery uvnitř úseku, amplifikovaného v prvním kole, je možno využít jednoho z vnějších primerů. Tento přístup bývá nazýván **seminested PCR**.

Podstatnou nevýhodou nested PCR je možnost kontaminace dříve amplifikovanými produkty, případně DNA z prostředí nebo použitých reagensů. Důsledkem je pak častý výskyt falešně pozitivních výsledků (Trtková *et* Raclavský, 2006).

Pro identifikaci kvasinek využili uvedený přístup např. Bougnoux *et al.* (1999). Autoři použili pět odlišných párů vnitřních primerů k amplifikaci specifických úseků genů pro rRNA u *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* a *C. glabrata*. Kanbe *et al.* (2002) zvolili pro identifikaci patogenních druhů kvasinek rodu *Candida* pomocí nested PCR směs specifických primerů, odvozených z genů pro DNA topoizomerázu II. Ahmad *et al.* (2002) ve své studii porovnali výsledky seminested PCR a biochemických souprav (ID 32 C a VITEK 2 YST) při druhové diferenciaci 76 izolátů kandid, prokázali přitom 99% shodu.

Obě popsané varianty bývají kombinovány s **mnohonásobnou (multiplex) PCR**, jež podle Pincuse *et al.* (2007) umožňuje detekci několika druhů kvasinek současně v jedné reakci. Vnější primery jsou zacíleny na univerzální sekvence genomu. Dojde tak nejprve k amplifikaci úseku DNA, který je společný více druhům z určitého kvasinkového rodu. Druhé kolo reakce probíhá se směsí dvojic druhově specifických vnitřních primerů a vzniklé produkty umožní diferenciaci. Hlavní výhodou této modifikace jsou nižší náklady. Využili ji např. Fujita *et al.* (2001) pro amplifikaci oblastí ITS1 a ITS2 u 120 kultur 45 sbírkových kmenů, zahrnujících 21 druhů kandid a sedm dalších rodů kvasinek, a 75 klinických izolátů šesti *Candida* spp. Chang *et al.* (2001) uvedeným způsobem odlišili izoláty *C. albicans*, získané z hemokultur, od non-*albicans* kandid.

V současné době je hojně využívána modifikace zvaná **kvantitativní PCR v reálném čase (real-time qPCR)**, detailně popsaná v několika přehledových pracích (Espy *et al.*, 2006; Mackay, 2004). Technika umožňuje kvantifikaci produktu PCR bezprostředně po jeho vzniku, v každém cyklu reakce. Amplifikace cílového úseku DNA je obvykle sledována s využitím fluorescence. Mezi nespecifická interkalační barviva, vážící se na nově tvořenou dsDNA, patří podle Trtkové *et* Raclavského (2006) SYBR Green I, BEBO, LC Green a BOXTO. Jinou možností sledování cyklického množení představují fluorescenčně značené primery nebo specifické sondy, hybridizující se střední částí amplifikovaného úseku (Pincus *et al.*, 2007). Během kopírování vlákna je DNA polymerázou odbourána molekula sondy s příslušným fluorochromem, což se projeví fluorescencí. Se vzrůstající délkou dsDNA se zvyšuje její intenzita. Detekci a kvantifikaci intenzity umožňuje fluorimetr, přímo integrovaný

do termocyklu. Hlavní výhodou popsané techniky je zkrácený časový interval potřebný k získání výsledků a snížení rizika falešné positivity redukcí postamplifikačních manipulací (Espy *et al.*, 2006; Hamal, 2007; Mackay, 2004).

Hsu *et al.* (2003) provedli pomocí real-time qPCR detekci a druhovou diferenciaci sedmi sbírkových kmenů a 50 klinických izolátů šesti druhů kandid, přičemž výsledky byly zcela v souladu s jejich biochemickou identifikací. White *et al.* (2003) rozlišili uvedenou metodou sedm druhů kandid. Bu *et al.* (2005) prokázali její vysokou citlivost a specifitu při studiu izolátů *C. albicans*, *C. krusei* a *C. tropicalis*.

Postamplifikační analýza

Jak již bylo uvedeno, pro druhovou identifikaci kvasinek je za určitých okolností nezbytné provést postamplifikační analýzu produktů. Uvedený proces zahrnuje řadu odlišných postupů.

Nejpřesnější je přímé **sekvencování** produktu. Ačkoli jsou v současné době již k dispozici automatizované komerčně dostupné systémy, využívající zmíněnou techniku pro identifikaci kvasinek, je pro rutinní laboratorní praxi stále příliš nákladná a pracná (Trtková *et Raclavský*, 2006). Uvedeným způsobem, s využitím soupravy MicroSeq D2 Large-Subunit Ribosomal DNA (Applied Biosystems), identifikovali 131 klinických izolátů, zahrnujících 19 různých druhů kandid a osm dalších rodů kvasinek, např. Hall *et al.* (2003).

Nákladnost sekvencování je nyní výrazně snižována aplikací alternativních technologií pro analýzu krátkých úseků DNA, zejména **pyrosekvencování** (Hamal, 2007; Pincus *et al.*, 2007). Principem je uvolnění pyrofosfátu při enzymatické syntéze DNA. Do tohoto procesu je zapojena kaskáda enzymatických reakcí. V konečném kroku je emitováno viditelné světlo, přičemž míra jeho emise je úměrná množství zabudovaných nukleotidů.

Pro identifikaci patogenních hub použili metodu poprvé Gharizadeh *et al.* (2004). Diferencovali celkem 20 sbírkových kmenů a klinických izolátů osmi různých druhů kandid. Bylo sekvencováno 40 bazí z amplifikované variabilní oblasti genu pro malou podjednotku rRNA (18S). Data byla analyzována metodou BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a porovnávána s databází GenBank. Metoda je podle autorů schopna simultánně analyzovat až 384 vzorků, má proto značný potenciál pro automatizaci.

Nejjednodušším postamplifikačním přístupem je podle Trtkové *et* Raclavského (2006) **délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů** (Amplified Fragment Length Polymorphism, **AFLP**). Po restrikci genomové DNA dvěma endonukleázami (běžnou a vzácnou), jsou k tzv. lepivým koncům vzniklých fragmentů připojeny (ligovány) dva různé adaptory se známou sekvencí. Následuje preselektivní PCR za použití dvou primerů, komplementárních k sekvencím adaptorů i restrikčních míst. Tím dojde k amplifikaci fragmentů, které mají adaptory ligované na obou koncích a naopak eliminaci rozlámaných nebo štěpených jen jednou endonukleázou. Dalším krokem je selektivní PCR s primery, na jejichž 3' konce jsou navázány 1 - 3 další, náhodně zvolené nukleotidy. Proto dochází k amplifikaci pouze fragmentů, které mají před připojením adaptorů nukleotidy komplementární s těmi, jež jsou přidány na 3' konce primerů. Uvedeným postupem se redukuje celkový počet amplifikovaných fragmentů DNA a zvyšuje čitelnost rozložení pruhů po elektroforetické separaci.

Vzhledem k tomu, že reakce probíhá za stringentních podmínek, je AFLP vysoce spolehlivou metodou. Nepotřebuje žádnou předchozí informaci o sekvencích DNA. Pečlivý výběr restrikčních enzymů a selektivních nukleotidů zajišťuje její vysokou rozlišovací schopnost (Hamał, 2007; Soll, 2000). Nevýhodou AFLP je naopak pracnost, nákladnost a nutnost speciálních odborných znalostí. Ball *et al.* (2004) identifikovali uvedenou metodou klinické izoláty *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* a *Saccharomyces cerevisiae* a potvrdili její velmi dobrou rozlišovací schopnost.

Trtková *et* Raclavský (2006) uvádějí, že při AFLP může být jeden ze selektivních primerů značen fluorochromem. Vzniklé produkty jsou poté separovány kapilární elektroforézou v automatickém sekvenátoru. Zmíněná modifikace se nazývá **délkový polymorfismus fluorescenčně značených amplifikovaných fragmentů** (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism, **FAFLP**).

Produkty PCR lze analyzovat také štěpením restrikčními endonukleázami, postup se nazývá **délkový polymorfismus restrikčních fragmentů** (Restriction Fragment Length Polymorphism, **RFLP**), dříve restrikční endonukleázová analýza. Cílová sekvence DNA je amplifikována pomocí primerů, komplementárních ke koncovým konzervovaným oblastem. Vzniklé produkty o konstantní délce, detekované na gelu, jsou následně štěpeny restrikční endonukleázou a fragmenty elektroforeticky separovány. Rozlišovací schopnost metody závisí na sekvenční variabilitě produktů PCR v místech rozpoznávaných endonukleázou nebo délce oblasti mezi dvěma

štěpenými místy. Výsledkem je charakteristické rozložení fragmentů DNA v gelu, umožňující diferencovat různé druhy kvasinek.

Dendis *et al.* (2003) využili PCR s následným RFLP k detekci a druhové identifikaci klinických izolátů *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* a *C. kefyr*. Amplifikovali oblast ITS2 a produkty štěpili pomocí restričních endonukleáz *HaeIII* a *TaqI*. Dále, pro odlišení blízce příbuzných druhů *C. albicans* a *C. dubliniensis* použili endonukleázu *Sau3AI*. Podle autorů je předností metody zejména jednoduchost provedení, spolehlivost a rychlost, neboť výsledky byly k dispozici během osmi hodin po dodání klinického materiálu do laboratoře.

Dalším postupem, analyzujícím amplikony, je **konformační polymorfismus jednovláknové DNA** (Single Strand Conformation Polymorphism, **SSCP**). Po denaturaci dvouřetězcových produktů PCR využívá odlišnou pohyblivost vzniklých jednovláknových DNA různých druhů kvasinek při elektroforéze v polyakrylamidovém gelu, což je důsledkem určitých rozdílů v jejich sekundární a terciární struktuře. Příčinou zmíněného jevu jsou podle Hamala (2007) menší odlišnosti v sekvencích vysoce konzervovaných úseků DNA. Mezi hlavní nevýhody popsané techniky, které brání jejímu širšímu využití v praxi, řadí Trtková *et* Raclavský (2006) především potřebu zvláštních odborných znalostí a pracnost.

Hui *et al.* (2000) identifikovali pomocí PCR a SSCP osm druhů kvasinek. Amplifikovali konzervované sekvence genu pro velkou podjednotku rRNA (28S). Jednovláknový produkt vizualizovali na gelu stříbrem. Kumar *et* Shukla (2006) využili k rozlišení kvasinek SSCP restričních fragmentů, získaných amplifikací genů pro malou a velkou podjednotku rRNA nested PCR, s následným štěpením produktů endonukleázami.

Dalším postamplifikačním přístupem, tentokrát bez časově náročné a pracné elektroforetické separace DNA, je **enzymová imunoanalýza (EIA)**. Obvykle je nejprve amplifikována oblast genů pro rRNA a identifikace následně provedena hybridizací s využitím dvou oligonukleotidových sond. První, rodově specifická, je značená biotinem, zbylá, zaměřená na druhovou identifikaci, digoxigeninem. Vytvořený hybridizační komplex je poté přenesen do jamek mikrotitrační destičky, potažených streptavidinem. Pozitivní reakce se projeví změnou barvy po přidání protilátky proti digoxigeninu, značené křenovou peroxidázou, a substrátu, štěpeného uvedeným

enzymem (Reiss *et al.*, 1998). Podle Hamala (2007) má PCR-EIA, díky své citlivosti a jednoduchosti provedení, potenciál pro vývoj komerčního automatizovaného systému.

Fujita *et al.* (1995) použili metodu k rozlišení *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* a *C. glabrata*. PCR byl amplifikován gen, kódující 5.8S podjednotku rRNA, a přilehlé oblasti ITS. Při přípravě druhově specifických sond byly využity sekvence odvozené z ITS2 oblasti, nacházející se mezi geny pro houbovou rRNA. Přitom byla zjištěna nižší specifita pouze u sondy, připravené pro identifikaci *C. glabrata*. Autoři navíc dokumentovali desetkrát vyšší citlivost PCR-EIA při porovnání s elektroforetickou detekcí. Elie *et al.* (1998) pomocí sond, rovněž komplementárních s ITS2 oblastí, byli schopni diferencovat dokonce 18 patogenních druhů kandid. Lindsley *et al.* (2001) využili ve své studii PCR-EIA pro identifikaci šesti druhů dimorfních a sedmi kvasinkovitých hub. Pomocí univerzálních primerů, homologních s geny pro rRNA, byl amplifikován produkt o délce 600 párů bází (bp). Diferenciace byla provedena opět sondami, odvozenými ze sekvencí ITS.

Nejperspektivnější identifikační technikou je podle Hamala (2007) kombinace PCR s technologií **DNA mikročipů**. Tvoří je mikroskopické sady oligonukleotidových sond, navázaných na pevný povrch a hybridizujících s fluorescenčně značenou nukleovou kyselinou ve vyšetřovaném vzorku. Dokonale odpovídající sekvence se navazují na komplementární lépe než nevhodně nebo nedokonale spojené hybridy, což se projeví silnějším signálem. Jeho intenzita je detekována pomocí fluorescenčního snímače s vysokým rozlišením a analyzována počítačovým programem. Pro účely identifikace, resp. typizace může tato metoda prokázat přítomnost a kvantitu různých variant sekvencí určitých genů, zejména pro rRNA, a v nich především oblasti ITS (Hamal, 2007; Trtková *et Raclavský*, 2006).

Výhodou metody je vysoká rozlišovací schopnost, rychlost, reprodukovatelnost a potřeba minimálních znalostí cílových sekvencí. Budou-li i nadále pokračovat projekty sekvencování DNA patogenních kvasinek, bude možné navrhnout i celogenomové mikročipy. Snížení nákladů na jejich výrobu stejně jako jednodušší správa velkého množství dat je podle výše uvedených autorů jen otázkou času.

Leinberger *et al.* (2005) vyvinuli diagnostický mikročip pro rychlou a simultánní identifikaci 12-ti klinicky nejvýznamnějších druhů aspergilů a kandid. Pomocí univerzálních houbových primerů byly amplifikovány a fluorescenčně označeny cílové oblasti ITS1 a ITS2. Oligonukleotidové sondy byly odvozeny

ze sekvencí ITS1 a/nebo ITS2. Uvedený mikročip byl podle autorů schopen rozlišit jednotlivé druhy přesně a velmi rychle, výsledek byl znám již během čtyř hodin po izolaci DNA.

Náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD)

Další hojně využívanou identifikační metodou, založenou na PCR, je náhodná amplifikace polymorfní DNA (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA, **RAPD**), která bývá občas uváděna pod názvem PCR s náhodnými primery (Arbitrarily Primed PCR, AP-PCR) (Trtková *et Raclavský*, 2006).

Podle Hamala (2007) a Powera (1996) je principem RAPD skutečnost, že krátké primery, jejichž sekvence není v přímém vztahu se žádnou specifickou sekvencí v analyzovaném genomu, se náhodně navazují na několika místech jeho DNA řetězců. Hybridizace probíhá v režimu s nízkou stringencí, které je dosaženo nižší reakční teplotou (35 - 40 °C) a přidáním chloridu hořečnatého o koncentraci 2,5 mmol/l. Taylor *et al.* (1999) uvádějí, že se při RAPD používá v jedné reakci vždy jen jeden typ primeru o délce nejčastěji 10 bp.

Soll (2000) popisuje, že nejprve hybridizuje vybraný oligonukleotidový primer s více nebo méně homologními sekvencemi na templátových DNA řetězcích kvasinkového genomu. Vyskytují-li se primerem rozpoznávané sekvence na obou vlákních DNA v protilehlých úsecích vzdálených asi 3 kilobáze, jsou pomocí *Taq* DNA polymerázy syntetizovány komplementární řetězce. Při druhé amplifikaci se k takto vzniklým řetězcům vytvářejí komplementární úseky, které jsou ohraničeny oběma hybridizačními místy. Četnost tvorby zmíněných fragmentů je při následujících amplifikacích nesrovnatelně vyšší než syntéza ostatních. V průběhu PCR se uvedeným způsobem tvoří velké množství specifických produktů variabilní délky, které jsou následně elektroforeticky separovány v agarózovém gelu.

Příklady praktického využití metody jsou uvedeny v kapitole 6.2.2.

3 Cíl práce

Hlavním cílem předložené diplomové práce bylo nalezení spolehlivého způsobu diferenciacie tří druhů kandid, které jsou pomocí běžně používaných identifikačních souprav obtížně rozlišitelné. Jednalo se o *C. fabianii*, *C. pelliculosa* a *C. utilis*.

K dosažení zmíněného hlavního cíle byl zvolen následující postup:

1. Vybrané izoláty uvedených druhů kvasinek byly podrobeny genetické analýze DNA pomocí techniky zvané Melting Curve of Random Amplified Polymorphic DNA, založené na rozdílech v teplotě tání produktů amplifikace variabilních oblastí genomu. Vzniklé křivky tání byly poté vzájemně porovnávány.
2. Byla provedena biochemická charakterizace tohoto souboru izolátů pomocí asimilačních a fermentačních profilů a bylo sledováno, nakolik jsou výsledky identifikace v souladu s jejich genetickou analýzou.
3. Nakonec bylo v literatuře vyhledáno, kolik případů mykóz způsobených uvedenými druhy kandid bylo dosud popsáno, se zaměřením na způsoby identifikace izolátů a s cílem najít případné nesrovnalosti vzhledem k obtížné vzájemné diferenciaci. Dále byla zjišťována četnost použití genetických přístupů pro jejich identifikaci se zaměřením na metodu RAPD.

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie, přístroje, materiál

4.1.1 Chemikálie

Chemikálie pro přípravu roztoků

Destilovaná H₂O - dH₂O (Aqual 29, [Aqual, Brno, ČR])

Difco Skim Milk (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)

Dithiothreitol - DTT (Sigma-Aldrich)

Etylendiaminotetraoctová kyselina - EDTA (Serva Electrophoresis, Heidelberg, SRN)

Glycerol (Sigma-Aldrich)

MgCl₂ · 6 H₂O (Pliva-Lachema, Brno, ČR)

Sorbitol (Pliva-Lachema, Brno, ČR)

Tris (AppliChem, Darmstadt, SRN)

Zymolyáza (Sigma-Aldrich)

Chemikálie pro přípravu PCR

dNTPs (Promega Corporation, Wisconsin, USA)

H₂O pro PCR (Top-Bio, Praha, ČR)

LCGreen I (Idaho Technology, Salt Lake City, USA)

MgCl₂ (Top-Bio, Praha, ČR)

Minerální olej pro PCR (Top-Bio, Praha, ČR)

PCR pufr bez MgCl₂ (Top-Bio, Praha, ČR)

Primer 5'-ACGGGCCAGT-3' (East Port, Praha, ČR)

Taq DNA polymeráza (Top-Bio, Praha, ČR)

4.1.2 Roztoky

Tabulka I. Lyzační roztok pro izolaci DNA (na jeden vzorek DNA)

Chemikálie	Objem (μ l)
2 mol/l sorbitol	2,50
100 mmol/l MgCl ₂	0,25
100 mmol/l DTT	0,10
12 U/ μ l zymolyáza	1,00
dH ₂ O	1,15
Celkem	5,00

Tabulka II. TE pufr (na jeden vzorek DNA)

Chemikálie	Objem (μ l)
0,5 mol/l EDTA	0,59
1 mol/l Tris	2,95
dH ₂ O	291,46
Celkem	295,00

Tabulka III. Reakční směs pro PCR (na jednu reakci)

Chemikálie	Objem (μ l)	Koncentrace
10 \times PCR pufr bez MgCl ₂	2,00	1 \times
25 mmol/l MgCl ₂	1,60	2 mmol/l
10 \times LCGreen I	2,00	1 \times
25 mmol/l dNTPs	0,16	0,20 mmol/l
80 μ mol/l primer	0,10	0,40 μ mol/l
5 U/ μ l <i>Taq</i> DNA polymeráza	1,00	0,25 U/ μ l
H ₂ O pro PCR	11,14	-
Templátová DNA	2,00	-
Celkem	20,00	

4.1.3 Biochemická identifikace kvasinek

Diagnostická souprava ID 32 C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francie)

Zymogramy (vlastní výroba): pH základního roztoku (viz Tab. IV) bylo upraveno na 7. Po 2 ml byl poté pipetován do zkumavek s plynovkou, které byly následně autoklávovány a uchovávány v lednici. Do zkumavek se základním roztokem byl přidán 1 ml 6% vodného roztoku příslušného cukru (glukózy, sacharózy, laktózy, maltózy nebo galaktózy), jenž byl připraven smícháním 12 g daného cukru s 200 ml dH₂O a vzniklý roztok byl sterilizován filtrací (\varnothing pórů 0,2 μ m)

Tabulka IV. Základní roztok pro přípravu zymogramů

Chemikálie	Množství
Bromthymolová modř	3,00 ml
Yeast extract	4,50 g
Proteose peptone	7,50 g
dH ₂ O	1000,00 ml

4.1.4 Kultivační půdy

CHROMagar Candida (CHROMagar Microbiology, Paris, Francie)

Sabouraudův dextrózový agar - SDA (Trios, Praha, ČR)

4.1.5 Přístroje a zařízení

Centrifuga EBA 12R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, SRN)

Centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet International, Woodbridge, USA)

Densitometr Densi-La-Meter (Pliva-Lachema, Brno, ČR)

High Resolution Melter HR-1 (Idaho Technology, Salt Lake City, USA)

Inkubátor BMT Eco cell (BMT Medical Technology, Brno, ČR)

Inkubátor BT 120 (Labo-MS, Praha, ČR)

Inkubátor MIR-154 (Sanyo Electric, Osaka, Japonsko)

Inkubátor Thermo Shaker TS-100 (Biosan Laboratories, Warren, USA)

Laminární box BioUltra 4 (Telstar BioUltra, Bristol, USA)

RoboCycler Gradient 96 (Stratagene, La Jolla, USA)

Stolní centrifuga Mini Centrifuge (Labnet International, Woodbridge, USA)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)

4.1.6 Počítačové programy

Apiweb (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francie)

HR-1 Melt Analysis Tool (Idaho Technology, Salt Lake City, USA)

Microsoft Office Excel 2003

4.1.7 Kultury kvasinek

Studovaný soubor byl tvořen celkem 61 kulturami kvasinek, údaje o nich jsou sumarizovány v Tab. V. Šest z nich bylo získáno z mezinárodních sbírek: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Nizozemsko (n=3); Culture Collection of Yeasts (CCY), Bratislava, Slovensko (n=1); Japan Collection

of Microorganisms (JCM), Wako-Shi, Japonsko (n=2). U kultur z CBS se jednalo o typové kmeny *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*. Dalších osm izolátů bylo poskytnuto laskavostí Davida H. Pincuse, bioMérieux, Hazelwood, USA. Zbylých 47 kultur pocházelo z klinického materiálu od pacientů Fakultní nemocnice Olomouc. Nejvíce jich bylo zachyceno z moči (n=17), následovaly nosohltan (n=11), bronchoalveolární laváž (n=6), endotracheální sekret (n=4), sputum (n=4), punktát (n=2), perianální stěr (n=1), pochva (n=1) a stolice (n=1). Další informace o jejich původu jsou sumarizovány v tabulce V.

Všechny kultury byly uloženy v mykologické sbírce na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc a uchovávány v hlubokomrazicím boxu při teplotě -70 °C v médiu obsahujícím 100 mg/ml Difco Skim Milk a 33 % glycerolu.

Z celkového počtu 61 studovaných izolátů bylo 42 ve sbírce evidováno jako *C. pelliculosa*, 14 jako *C. utilis* a 5 jako *C. fabianii*.

Tabulka V. Charakterizace studovaného souboru kvasinkových izolátů

Označení kultury	Kód pacienta	Pohlaví	Materiál	Klinika/oddělení	Zdroj	Původní identifikace
CBS 605					CBS	CAPE-TK
CBS 841					CBS	CAUT-TK
CBS 5481					CBS	CAFB-TK
CCY 38-20-1					CCY	CAFB
JCM 1624					JCM	CAUT
JCM 2345					JCM	CAUT
301444					Pincus	CAPE
301445					Pincus	CAPE
301446					Pincus	CAPE
301494					Pincus	CAUT
303902					Pincus	CAUT
80MR344					Pincus	CAFB
80MR415					Pincus	CAFB
82MR318					Pincus	CAFB
I1-CAUT-04	CadJi	M	BAL	IPCHO	FNOL	CAUT
I1-CAUT-21	HosDa	Ž	pochva	Interna	FNOL	CAUT
I1-CAUT-24	SotRo	M	moč	Urologie	FNOL	CAUT
I1-CAUT-30	KouOl	Ž	nosohltan	Interna	FNOL	CAUT
I1-CAUT-31	HorNa	Ž	sputum	HOK	FNOL	CAUT
I1-CAUT-32	SvaBo	Ž	moč	KAR	FNOL	CAUT
I1-CAUT-33	MitHe	Ž	nosohltan	Interna	FNOL	CAUT
I1-CAUT-34	CasJa	Ž	ETS	Neurochirurgie	FNOL	CAUT
I1-CAUT-35	HorKr	M	BAL	Dětská	FNOL	CAUT
I1-CAPE-16	SteAn	Ž	BAL	Novorozenecké	FNOL	CAPE
I1-CAPE-19	LacFr	M	BAL	Dětská	FNOL	CAPE
I1-CAPE-20	KutOl	M	BAL	Interna	FNOL	CAPE
I1-CAPE-27	BudJa	M	sputum	Interna	FNOL	CAPE

Označení kultury	Kód pacienta	Pohlaví	Materiál	Klinika/oddělení	Zdroj	Původní identifikace
I1-CAPE-30	SekKl	Ž	nosohltan	Dětská	FNOL	CAPE
I1-CAPE-37	SraPa	M	moč	Interna	FNOL	CAPE
I1-CAPE-38	Vy kMi	M	moč	Urologie	FNOL	CAPE
I1-CAPE-39	PesLu	M	punktát	Urologie	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-01	RosBo	Ž	BAL	Neurochirurgie	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-05	SroLe	Ž	moč	Urologie	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-06	MatMa	M	moč	Urologie	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-08	MucAn	Ž	nosohltan	Dětská	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-11	GalMi	M	nosohltan	Dětská	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-12	TomMa	M	nosohltan	Neurologie	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-13	RozMa	Ž	moč	Neurochirurgie	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-14	HasSa	Ž	moč	Dětská	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-15	PocMi	M	nosohltan	ORL	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-18	ZboVo	M	sputum	Interna	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-20	MatRu	M	moč	KAR	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-21	SkoMe	Ž	PS	Dětská	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-22	DolMa	M	stolice	HOK	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-23	TomAn	M	sputum	Interna	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-24	OrlPa	M	nosohltan	HOK	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-25	KosMa	M	ETS	Dětská	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-26	SivFi	M	nosohltan	Dětská	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-27	Vy mDa	Ž	moč	Geriatric	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-28	MraPa	M	moč	Interna	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-29	KriOn	M	moč	Dětská	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-30	AndKa	M	moč	Neurologie	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-32	RezMi	M	moč	TRN	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-33	DroZd	M	ETS	KAR	FNOL	CAPE
I1-CAPE2-34	Vy kJo	M	moč	Kardiochirurgie	FNOL	CAPE
I3-CAPE3-13	PecMa	Ž	nosohltan	Interna	FNOL	CAPE
I3-CAPE3-14	VarJi	Ž	punktát	Interna	FNOL	CAPE
I3-CAPE3-15	MajAn	Ž	nosohltan	Geriatric	FNOL	CAPE
I3-CAPE3-16	BucMa	Ž	moč	IPCHO	FNOL	CAPE
I3-CAPE3-17	JosMa	M	moč	Dětská	FNOL	CAPE
I3-CAPE3-20	OstJo	M	ETS	Interna	FNOL	CAPE

CBS - sbírka Centraalbureau voor Schimmelcultures; **CCY** - sbírka Culture Collection of Yeasts; **JCM** - sbírka Japan Collection of Microorganisms, Wako-Shi, Japonsko; **Pincus** - kmeny ze sbírky D. H. Pincuse; **FNOL** - Fakultní nemocnice Olomouc

CAPE - *Candida pelliculosa*; **CAUT** - *Candida utilis*; **CAFB** - *Candida fabianii*; **TK** - typový kmen
M - muž; **Ž** - žena

BAL - bronchoalveolární laváž; **ETS** - endotracheální sekret; **PS** - perianální stěr

IPCHO - Intenzivní péče chirurgických oborů; **HOK** - Hemato-onkologická klinika; **KAR** - Klinika anestezie a resuscitace; **ORL** - Otorhinolaryngologická klinika; **TRN** - Klinika tuberkulózy a respiračních onemocnění

4.2 Metodický postup

4.2.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena z lyzátů jednotlivých kolonií modifikací tzv. párátkové techniky, která byla popsána a optimalizována Steffanem *et al.* (1997). Kvasinkové izoláty byly nejprve očkované na SDA a inkubovány 24 h při 30 °C.

Po inkubaci byla desetina hmoty vyrostlé kolonie, tvořená přibližně 10^6 kvasinkových buněk, suspendována v 5 μ l čerstvě připraveného lyzačního roztoku (Tab. I). Směs byla poté homogenizována, odstředěna na stolní centrifuze a následně inkubována při 37 °C na třepačce (250 rpm, 30 min). Suspenze byla dále doplněna TE puftrem (Tab. II) do celkového objemu 300 μ l, opět homogenizována a centrifugována (1800 rpm, 2 min). Supernatant, obsahující izolovanou DNA, byl pipetován do sterilní zkumavky o objemu 0,5 ml a uchováván do dalšího použití při -20 °C.

4.2.2 Provedení McRAPD

Amplifikace DNA byla prováděna v RoboCycleru Gradient 96 v reakční směsi o celkovém objemu 20 μ l (Tab. III), která byla připravována ve zkumavkách umístěných v chladícím stojánku.

Nejprve byl namíchán tzv. premix, jenž obsahoval všechny reagentie kromě templátové DNA. Použitý primer 5'-ACGGGCCAGT-3' byl navržen Liu *et al.* (1996). Směs byla krátce homogenizována, odstředěna na stolní centrifuze a pipetována po 18 μ l do PCR mikrozkuvek. Následně byly přidány 2 μ l izolované DNA. Pro ověření čistoty reakce byla připravena negativní kontrola, která místo DNA obsahovala 2 μ l H₂O pro PCR. Po další homogenizaci a odstředění byla celá reakční směs překryta 10 μ l minerálního oleje pro PCR.

K amplifikaci byl využit empiricky optimalizovaný protokol PCR, jehož parametry jsou uvedeny v tabulce VI. Reprodukovatelnost výsledků byla ověřována opakovanou amplifikací izolovaných vzorků DNA, a to u celého studovaného souboru kvasinek.

Tabulka VI. Průběh PCR reakce

RoboCycler Gradient 96			
Proces	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	94	5	1
Denaturace DNA	94	1	
Hybridizace (annealing) primerů	48	1	45
Extenze komplementárního vlákna	72	1	
Finální extenze	72	10	1

4.2.3 Analýza dat

Amplikony byly podrobeny vysokorozlišovací analýze tání v přístroji High Resolution Melter HR-1.

Produkty PCR o objemu 6 μl byly pipetovány do skleněných kapilár umístěných ve vychlazeném kovovém stojánku. Poté byly utěsněny plastovou zátkou, centrifugovány (500 rpm, 1 min) a vloženy do zmíněného analyzátoru tání. Vzorky byly zahřívány při rychlosti změny teplotního profilu (RampRate) 0,3 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ze 75 na 95 $^{\circ}\text{C}$. Přitom docházelo k postupné denuraci dvouvláknových amplikonů, projevující se úbytkem fluorescence použitého barviva LCGreen I, což bylo průběžně detekováno.

Výsledná data, představující změny v intenzitě fluorescenčního signálu jednotlivých vzorků, byla analyzována pomocí programu HR-1 Melt Analysis Tool. Hodnoty relativní fluorescence byly nejprve vyneseny do grafu proti teplotě. Tím vznikly jednotlivé křivky tání, které byly následně normalizovány. Aby mohla být normalizace provedena u všech zkoumaných kvasinkových izolátů, bylo empiricky stanoveno rozmezí teplot před a za oblastí tání. Optimalizované intervaly byly 76,5 - 77,5 $^{\circ}\text{C}$ a 89,0 - 91,5 $^{\circ}\text{C}$.

V další fázi analýzy byla negativní derivace fluorescence vynesena do grafu proti teplotě ($-\text{dF}/\text{dT}$), což usnadnilo vizualizaci teploty tání (melting temperature, T_M), která odpovídala inflexnímu bodu denurační křivky. T_M amplifikovaného produktu byla stanovena jako teplota, při které křivka tání tvořila jasně rozpoznatelný vrchol.

Normalizovaná a derivovaná data byla následně exportována a zpracována v programu MS Office Excel 2003. Druhá identifikace všech 61 analyzovaných kultur byla provedena na základě vizuálního porovnávání normalizovaných a derivovaných křivek tání.

4.2.4 Fenotypová identifikace

Izoláty byly vyočkovány ze sbírky na CHROMagar Candida a inkubovány 72 h při 27 $^{\circ}\text{C}$. Poté byl vizuálně zhodnocen vzhled vyrostlých kolonií a čistota kultur.

Biochemická identifikace byla provedena diagnostickou soupravou ID 32 C. Postupováno bylo podle návodu výrobce. Stručně, z kultur vyrostlých na SDA po 24 h při 30 $^{\circ}\text{C}$ byla připravena suspenze, jejíž denzita odpovídala stupni 2 McFarlandovy zákalové řady. 250 μl tohoto roztoku bylo pipetováno do ampule s API C médiem a obsah poté homogenizován třepáním. Po 135 μl inokulovaného média bylo následně přenášeno do všech jamek soupravy, obsahujících dehydratované substráty. Inkubace probíhala v humidní atmosféře při 30 $^{\circ}\text{C}$. Hodnocení bylo provedeno vizuálně po 48 a 72 h porovnáváním denzity suspenzí v testovacích a kontrolní (negativní) jamce

bez substrátu. Identifikace byla provedena formou oktalového kódování a získaný číselný profil byl vyhodnocen programem Apiweb.

Fermentace pěti různých sacharidů (glukóza, sacharóza, laktóza, maltóza, galaktóza) byla prokazována pomocí zymogramů, konkrétně akumulací oxidu uhličitého v plynovce. Do zkumavky, obsahující živný roztok včetně příslušného sacharidu, bylo pipetováno 100 μ l kvasinkové suspenze o denzitě odpovídající stupni 2 McFarlandovy řady. Inkubace probíhala při teplotě 27 °C po dobu 21 dnů. Jako pozitivní byla zaznamenána každá zkumavka s výskytem bubliny v plynovce během uvedené doby inkubace.

5 Výsledky

5.1 Genetická diferenciacie kvasinek

Výsledky genetické identifikace studovaného souboru 61 kvasinkových izolátů pomocí zvolených podmínek McRAPD jsou shrnuty na obrázcích 1a a 1b a zaznamenány v tabulce VII. Vyplyvá z nich, že 51 kultur bylo určeno jako *C. fabianii* a po pěti *C. pelliculosa* a *C. utilis*. Veškeré výsledky genetické diferenciacie kmenů získaných z mezinárodních sbírek CCY, JCM a izolátů poskytnutých D. H. Pincusem se shodovaly s jejich původní identifikací (Tab. V). Podstatné rozdíly však byly zjištěny u 47 klinických izolátů. Devět kultur, původně deklarovaných jako *C. utilis* (Tab. V), bylo pomocí McRAPD identifikováno jako *C. fabianii*. Původní určení 38 izolátů jako *C. pelliculosa* (Tab. V), bylo McRAPD potvrzeno pouze u jediného (I1-CAPE2-22), zbylých 37 bylo identifikováno jako *C. fabianii*.

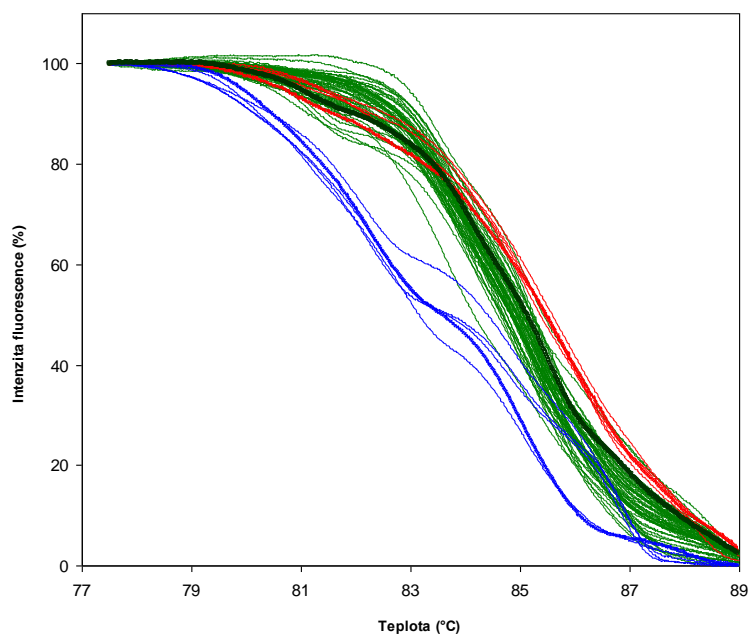
Vizuální analýza normalizovaných a derivovaných křivek tání umožnila jednoznačnou druhovou identifikaci všech izolátů. Jak je patrné z porovnání obrázků 1a a 1b, rozdíly jsou lépe viditelné na derivovaných křivkách. Opakovaným testováním byly dosaženy vysoce reprodukovatelné křivky tání s nízkou variabilitou.

Typové kmeny *Candida fabianii* CBS 5481, *Candida pelliculosa* CBS 605 a *Candida utilis* CBS 841 byly pomocí McRAPD od sebe dobře odlišitelné, jak vyplyvá z obrázků 2a a 2b.

Sbírkové kmeny a klinické izoláty byly rozlišeny na základě vizuálního porovnání křivek tání s jedinečnými profily typových kmenů. Charakteristický tvar normalizovaných křivek tání i pozice jejich jednotlivých vrcholů odvozených z derivovaných dat umožnily jednoznačné rozlišení souborů *C. fabianii* a *C. pelliculosa* (Obr. 3a a 3b), *C. fabianii* a *C. utilis* (Obr. 4a a 4b) i *C. pelliculosa* a *C. utilis* (Obr. 5a a 5b). Dále, na obrázcích 3b, 4b a 5b je dobře patrná určitá vnitrodruhová variabilita izolátů. Pomocí McRAPD tak mohlo být v rámci zkoumaných druhů rozpoznáno několik odlišných genotypů.

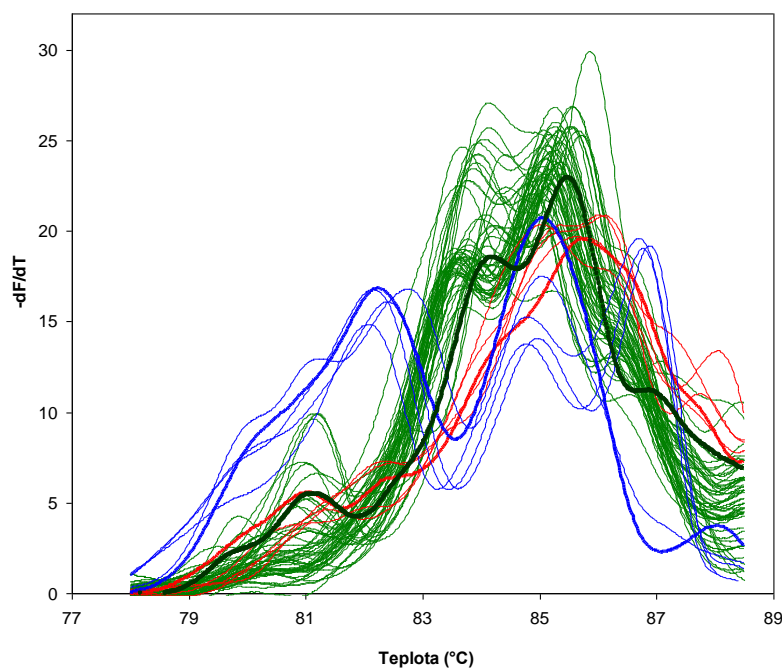
Variabilita křivek tání u *C. fabianii*, *C. pelliculosa* a *C. utilis* je patrná také na obrázcích 6a, 6b a 6c. Jsou na nich znázorněny průměrné křivky vycházející z derivovaných dat a k nim příslušné směrodatné odchylky. Při vzájemném porovnávání dvojic souborů jednotlivých druhů byly opět prokázány výrazné rozdíly.

Obrázek 1a. Normalizované křivky tání studovaného souboru kvasinek



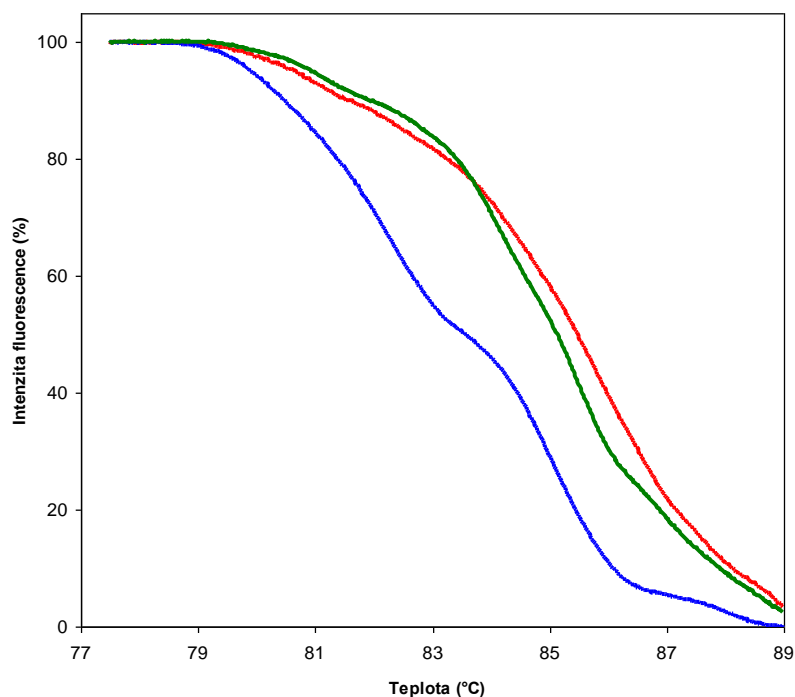
Tenké zelené čáry reprezentují izoláty *Candida fabianii*, silná zelená čára typový kmen *C. fabianii* CBS 5481; tenké modré čáry představují izoláty *Candida pelliculosa*, silná modrá čára typový kmen *C. pelliculosa* CBS 605; tenkou červenou čarou jsou značeny izoláty *Candida utilis*, silnou červenou čarou typový kmen *C. utilis* CBS 841

Obrázek 1b. Derivované křivky tání studovaného souboru kvasinek



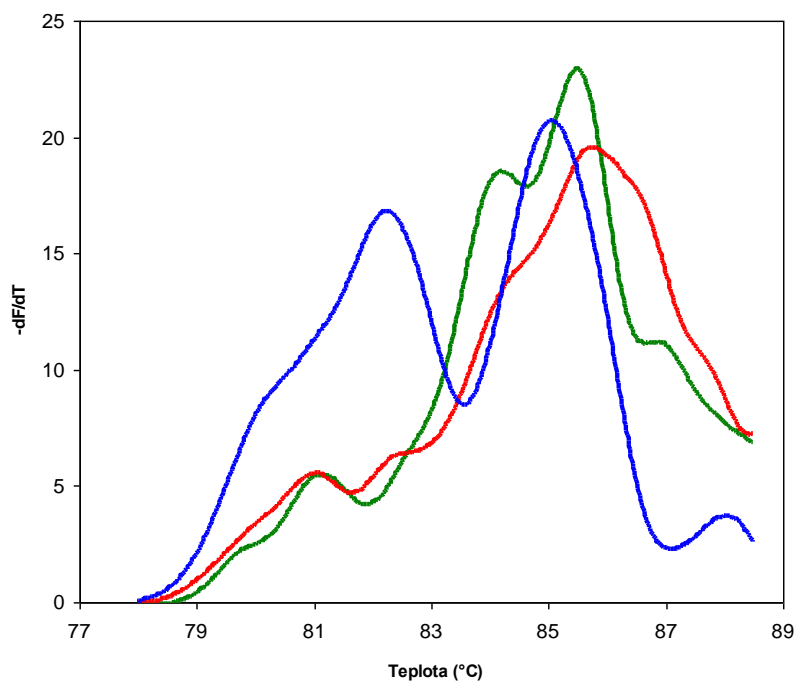
Tenké zelené čáry reprezentují izoláty *Candida fabianii*, silná zelená čára typový kmen *C. fabianii* CBS 5481; tenké modré čáry představují izoláty *Candida pelliculosa*, silnou modrou čarou je značen typový kmen *C. pelliculosa* CBS 605; tenkou červenou čarou jsou značeny izoláty *Candida utilis*, silnou červenou čarou typový kmen *C. utilis* CBS 841

Obrázek 2a. Normalizované křivky tání typových kmenů *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*



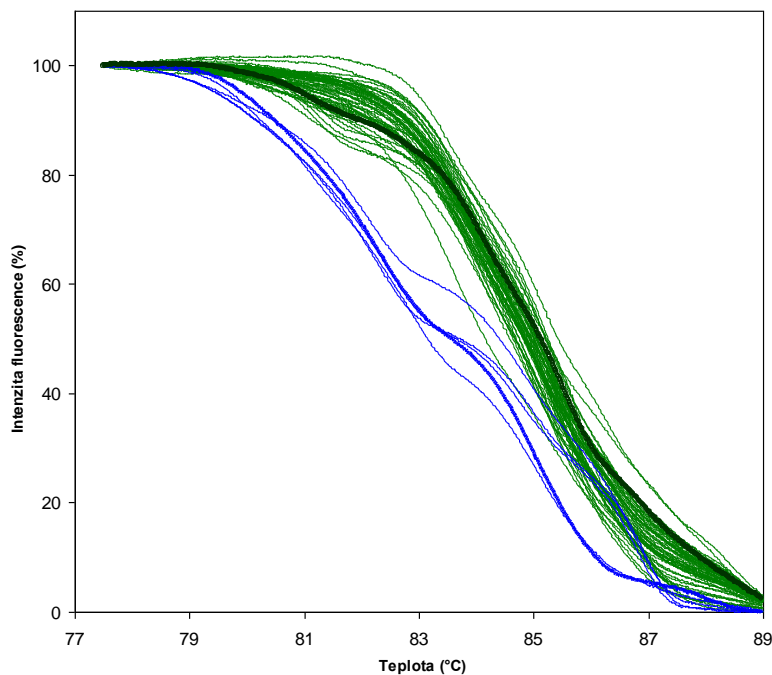
Zelenou čarou je značen typový kmen *C. fabianii* CBS 5481, modrou typový kmen *C. pelliculosa* CBS 605 a červenou typový kmen *C. utilis* CBS 841

Obrázek 2b. Derivované křivky tání typových kmenů *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*



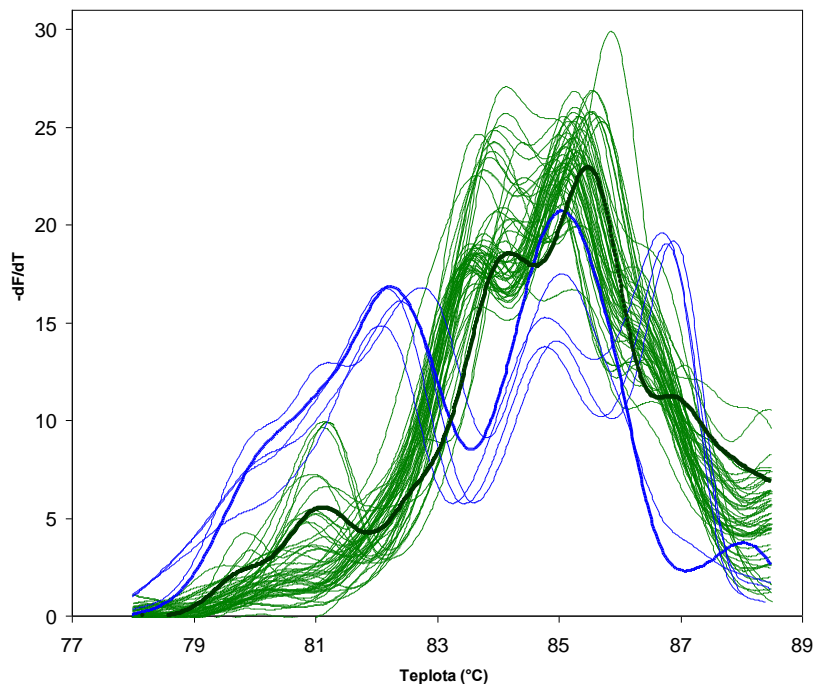
Zelenou čarou je značen typový kmen *C. fabianii* CBS 5481, modrou typový kmen *C. pelliculosa* CBS 605 a červenou typový kmen *C. utilis* CBS 841

Obrázek 3a. Porovnání normalizovaných křivek tání *Candida fabianii* a *Candida pelliculosa*



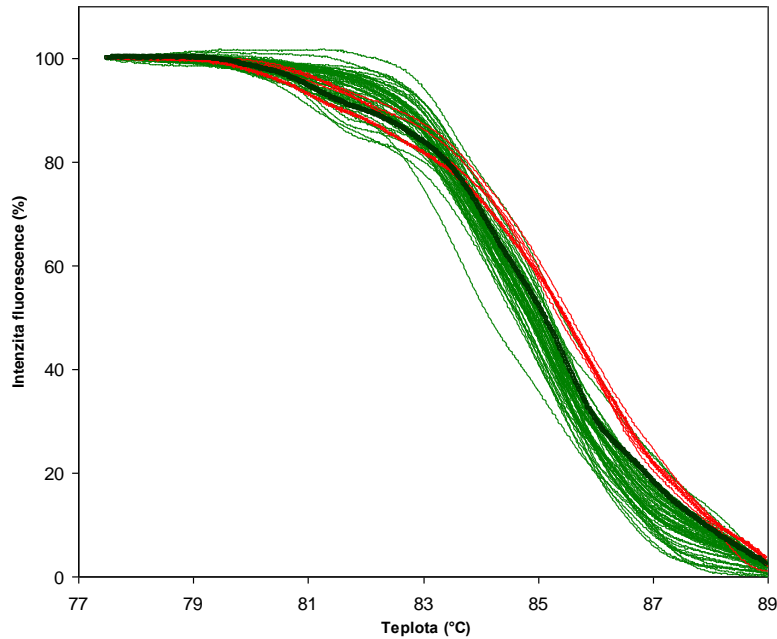
Tenkými zelenými čarami jsou označeny izoláty *C. fabianii*, silnou zelenou čarou typový kmen *C. fabianii* CBS 5481; tenké modré čáry představují izoláty *C. pelliculosa*, silná modrá čára typový kmen *C. pelliculosa* CBS 605

Obrázek 3b. Porovnání derivovaných křivek tání *Candida fabianii* a *Candida pelliculosa*



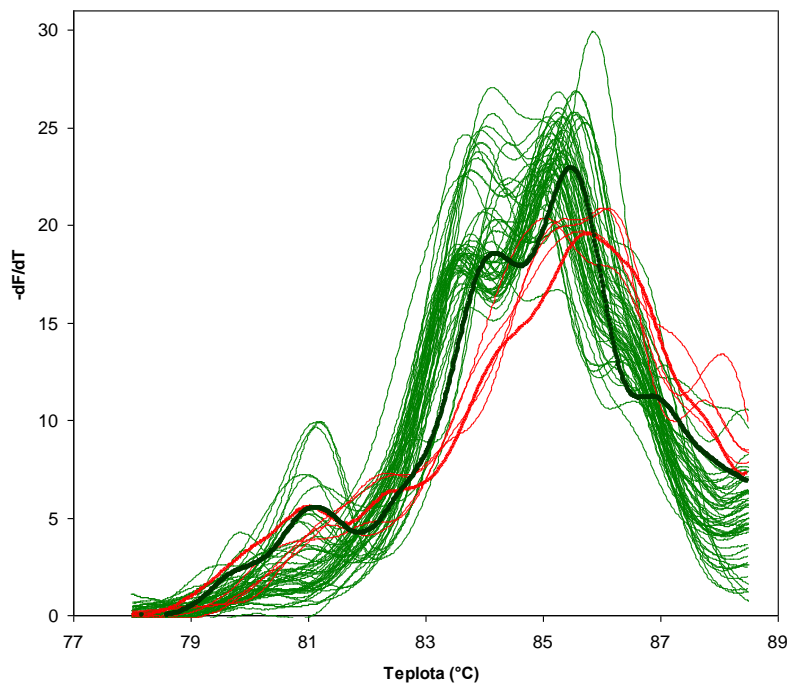
Tenkými zelenými čarami jsou označeny izoláty *C. fabianii*, silnou zelenou čarou typový kmen *C. fabianii* CBS 5481; tenké modré čáry představují izoláty *C. pelliculosa*, silná modrá čára typový kmen *C. pelliculosa* CBS 605

Obrázek 4a. Porovnání normalizovaných křivek tání *Candida fabianii* a *Candida utilis*



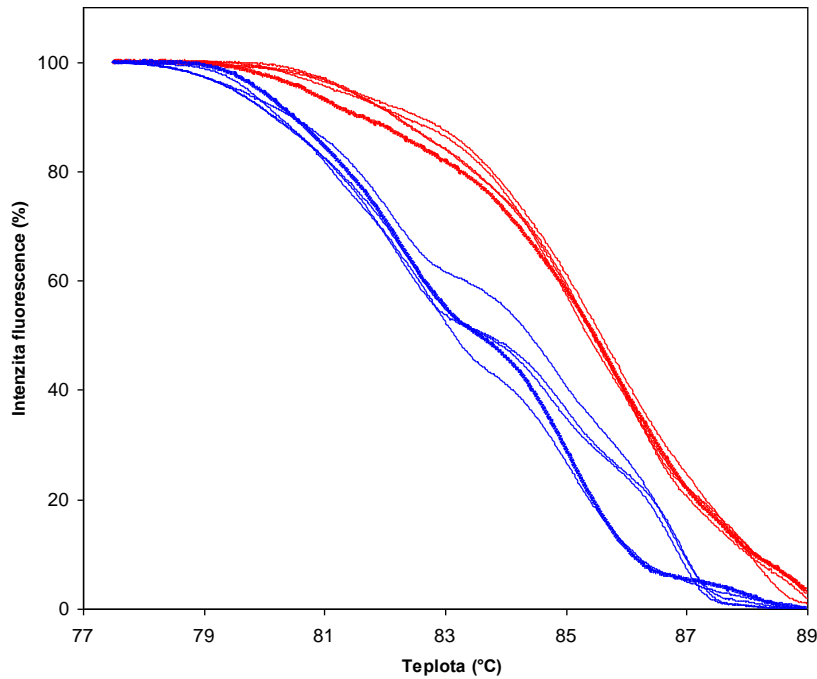
Tenkými zelenými čarami jsou označeny izoláty *C. fabianii*, silnou zelenou čarou typový kmen *C. fabianii* CBS 5481; tenké červené čáry představují izoláty *C. utilis*, tlustá červená čára typový kmen *C. utilis* CBS 841

Obrázek 4b. Porovnání derivovaných křivek tání *Candida fabianii* a *Candida utilis*



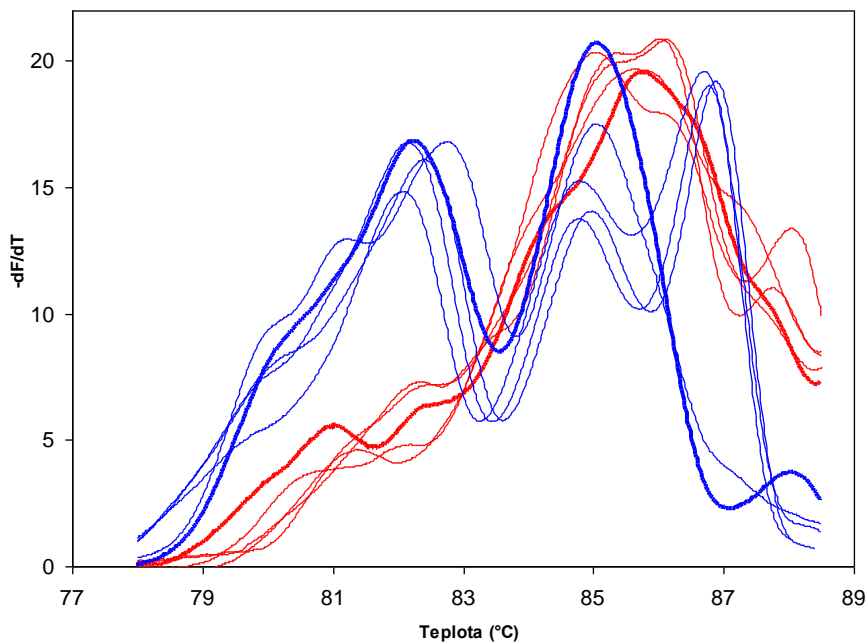
Tenkými zelenými čarami jsou označeny izoláty *C. fabianii*, silnou zelenou čarou typový kmen *C. fabianii* CBS 5481; tenké červené čáry představují izoláty *C. utilis*, tlustá červená čára typový kmen *C. utilis* CBS 841

Obrázek 5a. Porovnání normalizovaných křivek tání *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*



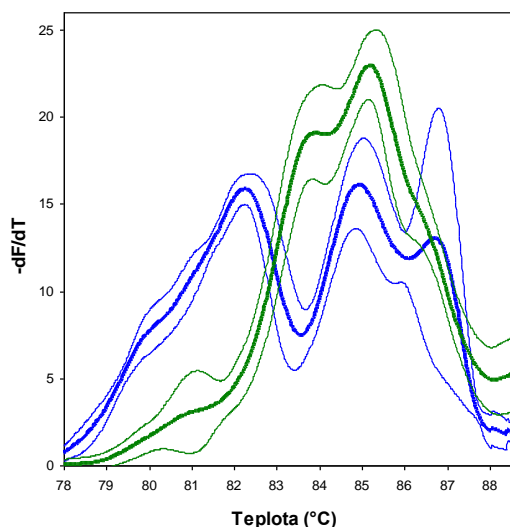
Tenkými modrými čarami jsou označeny izoláty *C. pelliculosa*, silnou modrou čarou typový kmen *C. pelliculosa* CBS 605; tenké červené čáry představují izoláty *C. utilis*, silná červená čára typový kmen *C. utilis* CBS 841

Obrázek 5b. Porovnání derivovaných křivek tání *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*



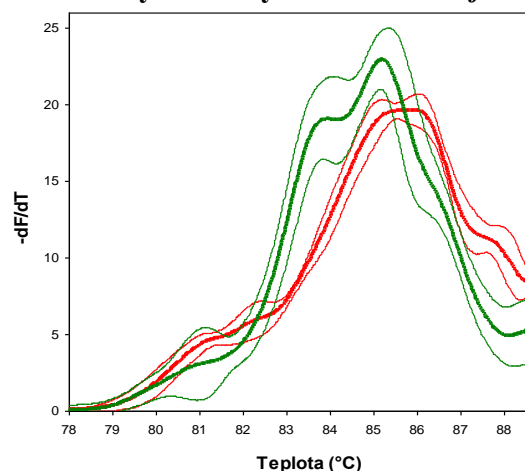
Tenkými modrými čarami jsou označeny izoláty *C. pelliculosa*, silnou modrou čarou typový kmen *C. pelliculosa* CBS 605; tenké červené čáry představují izoláty *C. utilis*, silná červená čára typový kmen *C. utilis* CBS 841

Obrázek 6a. Porovnání průměrných derivovaných křivek tání a jejich směrodatných odchylek u *Candida fabianii* a *Candida pelliculosa*



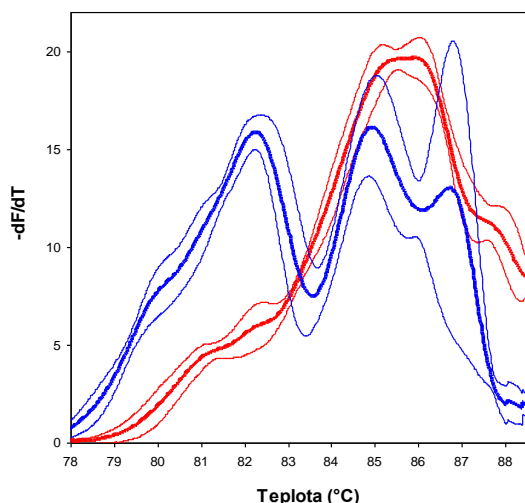
Silná zelená čára reprezentuje průměrnou křivku tání izolátů *C. fabianii*, tenké zelené čáry její směrodatné odchylky; silná modrá čára představuje průměrnou křivku tání izolátů *C. pelliculosa*, tenké modré čáry její směrodatné odchylky

Obrázek 6b. Porovnání průměrných derivovaných křivek tání a jejich směrodatných odchylek u *Candida fabianii* a *Candida utilis*



Silná zelená čára reprezentuje průměrnou křivku tání izolátů *C. fabianii*, tenké zelené čáry její směrodatné odchylky; silná červená čára představuje průměrnou křivku tání izolátů *C. utilis*, tenké červené čáry její směrodatné odchylky

Obrázek 6c. Porovnání průměrných derivovaných křivek tání a jejich směrodatných odchylek u *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*



Silná modrá čára reprezentuje průměrnou křivku tání izolátů *C. pelliculosa*, tenké modré čáry její směrodatné odchylky; silná červená čára představuje průměrnou křivku tání izolátů *C. utilis*, tenké červené čáry její směrodatné odchylky

5.2 Biochemická identifikace kvasinek

Výsledky biochemické identifikace 61 kvasinkových izolátů jsou demonstrovány v tabulce VII.

Programem Apiweb nebylo možno potvrdit genetickou identifikaci izolátů *Candida fabianii*, protože uvedený druh kvasinky není začleněn do jeho databáze. Pro kultury určené McRAPD jako *C. fabianii* byly nalezeny čtyři různé číselné profily, jež byly programem Apiweb vyhodnoceny jako *C. pelliculosa* nebo *C. utilis*. Nejpočetnější byl kód 4275350311 (n=24, 47,1 %) se závěrem *C. utilis* s procentuální pravděpodobností (%id) 90,1. Následoval profil 4275350111 (n=22, 43,1 %) vyhodnocený jako *C. pelliculosa* (%id=57,3), resp. *C. utilis* (%id=42,6). U zbylých izolátů byly stanoveny kódy 4274350111 (n=3, 5,9 %) se závěrem *C. pelliculosa* (%id=98,5) a 5275350311 (n=2, 3,9 %) s výsledkem rovněž *C. pelliculosa* (%id=98,7).

U izolátů geneticky identifikovaných jako *C. pelliculosa* (n=5) byl uvedený závěr programem Apiweb vždy potvrzen (%id=99,8-99,9). V rámci zmíněného druhu bylo možno rozlišit pět biotypů, každý s četností 20 %. Jednalo se o kódové profily 4275351311, 4275751311, 5275351111, 5275351311 a 5275751111.

Izoláty, které byly analýzou křivek tání určeny jako *Candida utilis* (n=5), byly rovněž biochemicky potvrzeny (%id=94,7-99,9). Přitom byly získány tři různé numerické profily. Nejpočetněji se vyskytoval 4275250311 (n=3), následovaly 4275250101 (n=1) a 4274250301 (n=1).

Při hodnocení zymogramů (Tab. VII) bylo zjištěno, že všechny testované kandidy fermentovaly glukózu a sacharózu a naopak žádný laktózu. Maltózu zkvašovaly všechny kultury *C. pelliculosa* a *C. fabianii*, u posledně zmíněného druhu s jedinou výjimkou, sbírkovým izolátem CCY 38-20-1. Nefermentovala ji však žádná *C. utilis*, což ovšem patří mezi její charakteristické znaky. Galaktózu kvasily pouze čtyři z pěti kultur *C. pelliculosa*.

Tabulka VII. Biochemická a genetická identifikace izolátů

Označení kultury	Profil	ID 32 C Identifikace (%id)	Fermentace	McRAPD Identifikace
CBS 605	4275751311	CAPE (99,9)	++-++	CAPE
CBS 841	4275250311	CAUT (99,8)	++---	CAUT
CBS 5481	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
CCY 38-20-1	4275350311	CAUT (90,1)	++---	CAFB
JCM 1624	4275250311	CAUT (99,8)	++---	CAUT
JCM 2345	4275250311	CAUT (99,8)	++---	CAUT
301444	4275351311	CAPE (99,8)	++-+-	CAPE

Označení kultury	Profil	ID 32 C Identifikace (% id)	Fermentace	McRAPD Identifikace
301445	5275351311	CAPE (99,9)	++-++	CAPE
301446	5275751111	CAPE (99,9)	++-++	CAPE
301494	4274250301	CAUT (94,7)	++----	CAUT
303902	4275250101	CAUT (99,9)	++----	CAUT
80MR344	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
80MR415	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
82MR318	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAUT-04	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAUT-21	5275350311	CAPE (98,7)	++-+-	CAFB
II-CAUT-24	4274350111	CAPE (98,5)	++-+-	CAFB
II-CAUT-30	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAUT-31	5275350311	CAPE (98,7)	++-+-	CAFB
II-CAUT-32	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAUT-33	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAUT-34	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAUT-35	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE-16	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE-19	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE-20	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE-27	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE-30	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE-37	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE-38	4274350111	CAPE (98,5)	++-+-	CAFB
II-CAPE-39	4274350111	CAPE (98,5)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-01	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-05	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-06	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-08	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-11	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-12	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-13	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-14	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-15	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-18	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-20	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-21	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-22	5275351111	CAPE (99,9)	++-++	CAPE
II-CAPE2-23	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-24	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-25	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-26	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-27	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-28	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-29	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-30	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-32	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-33	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
II-CAPE2-34	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
I3-CAPE3-13	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
I3-CAPE3-14	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
I3-CAPE3-15	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
I3-CAPE3-16	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB
I3-CAPE3-17	4275350111	CAPE (57,3); CAUT (42,6)	++-+-	CAFB
I3-CAPE3-20	4275350311	CAUT (90,1)	++-+-	CAFB

%id - procentuální pravděpodobnost druhové identifikace

CAPE - *Candida pelliculosa*; CAUT - *Candida utilis*; CAFB - *Candida fabianii*

6 Diskuse

6.1 Kazuistiky mykóz způsobených druhu *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*

6.1.1 Mykotické infekce způsobené *C. fabianii*

Jedná se o anamorfní stádium druhu *Pichia fabianii*, původně patřící do rodu *Hansenula*. Na základě sekvencování genů kódujících velkou a malou podjednotku rRNA a translační elongační faktor 1 α je však dnes řazen Kurtzmanem *et al.* (2008) do nového rodu *Lindnera*. *C. fabianii* byla izolována z půdy, nálevky brouka *Xylion adustus*, rýžového fermentátu získaného metabolickou činností vláknité houby *Aspergillus oryzae* a zařízení na výrobu butylglykolu pomocí bakterie *Enterobacter aerogenes* (Kurtzman *et al.*, 1998; Valenza *et al.*, 2006).

C. fabianii nebyla a dosud stále není součástí žádné z kvasinkových databází běžně používaných komerčních identifikačních souprav. Uvedená skutečnost je pravděpodobně hlavním důvodem, že v dostupných literárních databázích jsou zařazeny pouze čtyři případy lidských infekcí způsobených tímto druhem.

První popsali Dooley *et al.* (1990) u 57-letého muže s chronickou lymfocytární leukémií a dlouhodobě recidivující infekcí močových cest. Uvedená kvasinka byla prokázána ve vzorcích moči a byla příčinou zánětu předstojné žlázy. Izolát byl nejprve pomocí soupravy API 20 C AUX (bioMérieux) identifikován jako *C. pelliculosa*. Další testy, zahrnující negativní asimilaci erytritolu a neschopnost růstu na médiu bez vitamínů, vedly k podezření, že se jedná o *C. fabianii*. Uvedená hypotéza byla potvrzena stanovením obsahu guaninu a cytozinu v buňce, který činil 47,3 %. Později byla identifikace potvrzena průkazem askospor kloboukovitého tvaru po párování s komplementárním typem NRRL Y-1873. Mykóza byla vyléčena amfotericinem B.

Bhally *et al.* (2006) dokumentovali fungémii způsobenou *C. fabianii* u předčasně narozené pětítýdenní holčičky, u níž byl zjištěn syndrom dechové tísně a nekrotizující enterokolitida. Soupravou API 20 C AUX nebylo možno kvasinku určit, neboť zjištěný biokód nebyl v databázi nalezen. Podařilo se ji však identifikovat geneticky ve dvou nezávislých laboratořích, na základě sekvencování oblasti DNA kódující variabilní D1/D2 doménu velké podjednotky rRNA a pomocí komerční soupravy MicroSeq

D2 Large-Subunit Ribosomal DNA (Applied Biosystems). Pacientka byla úspěšně léčena amfotericinem B a odstraněním centrálního venózního katétru.

Valenza *et al.* (2006) popsali letální septikémií u 46-letého muže hospitalizovaného v univerzitní nemocnici ve Würzburgu s pneumonií a septickým šokem vyvolaným *Streptococcus pneumoniae*. Později u něj došlo k rozvoji polymikrobiální sekundární infekce. *C. fabianii* byla izolována z bronchoalveolární laváže a krve pacienta, který nakonec zemřel na multiorgánové selhání. Soupravou ID 32 C (bioMérieux) nebylo možno kulturu určit. Pomocí automatizovaného systému VITEK 2 YST (bioMérieux) byl izolát identifikován jako *C. utilis* s 93,3% pravděpodobností. Sekvencováním ITS oblastí genů pro rRNA byla zjištěna 99% shoda s typovým kmenem *C. fabianii* CBS 5640. Pacient byl léčen flukonazolem, později kaspofunginem.

První případ endokarditidy a zároveň čtvrtou lidskou infekci způsobenou uvedeným kvasinkovým druhem publikovali Hamal *et al.* (2008) v ČR. *C. fabianii* byla opakovaně izolována z krve 40-letého muže s vrozenou srdeční vadou. Izoláty byly charakterizovány morfologicky a biochemicky včetně použití soupravy ID 32 C. Vždy byl získán stejný kód, vyhodnocený programem Apilab Plus (bioMérieux) jako *C. pelliculosa* (%id=57,3), resp. *C. utilis* (%id=42,6). Všechny kultury fermentovaly glukózu, sacharózu a maltózu, naopak nezkvašovaly laktózu a galaktózu. Poté bylo provedeno u jednoho z izolátů přímé sekvencování ITS2 oblasti genů pro rRNA. Přitom byla zjištěna 100% homologie s typovým kmenem *C. fabianii* CBS 5640, shoda s typovým kmenem *C. pelliculosa* CBS 605 byla pouze 56 %. Pacient byl léčen flukonazolem, později vorikonazolem, což vedlo k rozvoji rezistence k oběma antimykotikům. Endokarditida byla vyléčena amfotericinem B.

6.1.2 Mykotické infekce způsobené *C. pelliculosa*

C. pelliculosa je imperfektním stádiem druhu *P. anomala*, který, podobně jako *P. fabianii*, dříve patřil do rodu *Hansenula*. Podle výše uvedené taxonomické studie Kurtzmana *et al.* (2008) je nyní klasifikován jako *Wickerhamomyces anomalus*. Uvedená kvasinka bývá nalézána v půdě, vzduchu, vodě, ovoci, exudátech stromů i zvířecím materiálu, bývá součástí normální či přechodné mikroflóry kůže, ústní dutiny a zažívacího traktu lidského organismu (Fragner, 1992).

První případ hematogenní infekce způsobené jmenovaným druhem ve své studii publikovali Nohinek *et al.* (1987). Jednalo se o infekční endokarditidu u 40-letého

muže. Identifikace izolátů z hemokultur byla provedena soupravou API 20 C AUX a systémem pro identifikaci kvasinek firmy Abbott.

Thuler *et al.* (1997) popsali miniepidemii fungemií vyvolaných *C. pelliculosa* v hemato-onkologickém centru v Rio de Janeiru. Izoláty byly identifikovány na základě morfolgie a biochemicky soupravou Rapid Yeast Identification Panel (Dade Microscan).

Chakrabarti *et al.* (2001) objasňovali zdroj další miniepidemie hematogenních infekcí na dětském oddělení v nemocnici v severní Indii. Určení izolátů *C. pelliculosa* bylo provedeno na základě mikromorfologie, blíže nespecifikovaných testů asimilace sacharidů a průkazu askospor. U čtyř náhodně vybraných kultur byla identifikace ověřena v referenční laboratoři amerického Centra pro kontrolu a prevenci nemocí.

Bakir *et al.* (2004) popsali přítomnost *C. pelliculosa* v krevním oběhu pěti imunokompromitovaných dětí hospitalizovaných v nemocnici v Istanbulu. Kultury byly identifikovány soupravou ID 32 C a průkazem askospor.

Pasqualotto *et al.* (2005) popsali miniepidemii fungemie na dětské jednotce intenzivní péče s vysokou mírou mortality (41,2 %). Druhovú determinace *C. pelliculosa* byla provedena na základě mikromorfologie včetně hodnocení askospor, biochemicky soupravou ID 32 C.

6.1.3 Mykotické infekce způsobené *C. utilis*

Teleomorfou uvedeného druhu je *Pichia jadinii*, dříve rovněž patřící do rodu *Hansenula*. Podle zmiňované recentní studie Kurtzman *et al.* (2008) byla, podobně jako *C. fabianii*, nedávno zařazena do rodu *Lindnera*. Fragner (1992) uvádí, že se tento druh, ještě pod jménem *Torula utilis*, využíval k výrobě nutriční moučky pro doplnění stravy obyvatelstva v tropech a zvířat u nás. Byl zachycen na květinách a prokázán v trávicím systému krav.

Jako první publikovali případ mykózy způsobené *C. utilis* Alsina *et al.* (1988). Jednalo se o fungemii u pětiletého chlapce s AIDS (syndrom získaného selhání imunity), zřejmě spojenou se zavedením intravenózního katétru. Kvasinka byla nejprve identifikována zhodnocením mikromorfologie na kukuřičném agaru a biochemických vlastností: asimilace KNO_3 a utilizace zdrojů uhlíku soupravou API 20 C AUX. Výsledný kód však nebyl v její databázi nalezen. Proto byla provedena hybridizace DNA se sondou odvozenou z oblasti, kde se nachází gen kódující aktin. Vytvořený fingerprint byl porovnán s profily všech známých druhů kandid, přitom bylo zjištěno,

že se jedná o *C. utilis*. Na základě této studie byl uvedený druh zařazen do seznamu agens souvisejících s lidskými infekcemi.

Druhý případ fungémie popsali Bounoux *et al.* (1993) u 68-letého muže trpícího Alzheimerovou chorobou. Určení izolátu bylo provedeno zhodnocením vzhledu kvasinkových buněk na kukuřičném agaru a biochemicky soupravami API 20 C AUX a ID 32 C. Ověření správnosti identifikace bylo provedeno stanovením obsahu guaninu a cytosinu v buňce a DNA-DNA reasociacemi.

Hazen *et al.* (1999) prokázali *C. utilis* jako příčinu chronické infekce močových cest 88-letého muže. Opakovaně zachycený kmen byl identifikován na základě mikromorfologie na kukuřičném agaru a biochemicky soupravami API 20 C AUX a RapID Yeast Plus (ThermoFischer Scientific, Remel Products).

6.1.4 Způsoby rozlišení *C. fabianii*, *C. pelliculosa* a *C. utilis*

Z popsáných studií vyplývá, že izoláty druhů *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* je možno s velkou pravděpodobností správně identifikovat pomocí běžných fenotypových technik. Totéž však nelze říci o určování kultur *Candida fabianii*. Vzhledem k absenci uvedeného druhu v databázích běžně používaných komerčních souprav, bývají izoláty vyhodnoceny jako *C. pelliculosa* nebo *C. utilis*. Spolehlivý nástroj identifikace představují v současné době pouze genetické metody. Uvedená skutečnost byla potvrzena i naší studií, kdy původně chybně určené izoláty druhu *C. fabianii* byly jednoznačně odlišeny charakterem křivek tání od profilů správně identifikovaných kultur *C. pelliculosa* a *C. utilis*.

Část autorů prováděla, zejména v případě *C. pelliculosa*, ověření identifikace na základě hodnocení tvorby a morfologie askospor. Pravděpodobnost chybné druhové identifikace zde byla velmi malá, protože naprostá většina divokých kmenů *C. fabianii* je asporogenní. Potřeba speciálních médií a dlouhá inkubační doba však do značné míry limituje praktické využití jejich průkazu. Navíc určování druhů, založené na sekvenční analýze, je spolehlivější než hodnocení fenotypových znaků.

6.2 Diferenciace kvasinkových druhů pomocí McRAPD

V naší studii bylo prokázáno, že McRAPD je slibnou alternativou tradičních fenotypových metod identifikace patogenních kvasinek. Interpretace získaných dat byla provedena jednoduchou a rychlou vizuální analýzou normalizovaných a derivovaných

křivek tání, která umožnila jednoznačnou druhovou identifikaci všech analyzovaných kultur.

6.2.1 Hodnocení RAPD

Aby bylo možno posoudit potenciál McRAPD, měly by být nejprve zváženy hlavní výhody a nedostatky samotné RAPD.

Podle Hamala *et al.* (2005) a Sullivana *et al.* (1996) je předností RAPD zejména rychlost získání výsledků, jednoduché provedení, ekonomická nenáročnost a vysoká rozlišovací schopnost. Je možno ji aplikovat na jakékoli druhy mikroorganismů, protože není třeba znát jejich sekvence DNA (Power, 1996).

Největší nevýhodou je naopak nízká reprodukovatelnost, zejména mezilaboratorní, neboť metoda je velice citlivá ke změnám reakčních podmínek. Proto vzhled a uspořádání pruhů fingerprintu může být ovlivněn mnoha faktory, zahrnující množství Mg^{2+} , poměr primer/templátová DNA, koncentraci a původ *Taq* DNA polymerázy, typ termocykleru atd. (Khandka *et al.*, 1997; Meunier *et* Grimont, 1993; Penner *et al.*, 1993). Trtková *et* Raclavský (2006) upozorňují na jeden z dalších problémů RAPD. Jedná se o možnou subjektivní interpretaci výsledků během složitého porovnávání komplexních fingerprintů, obsahujících pruhy různé intenzity.

6.2.2 Příklady využití RAPD v klinických studiích

Pro své výhody byla RAPD využita v řadě studií zaměřených na identifikaci klinických izolátů lékařsky významných druhů patogenních kvasinek.

Metodu využili pro diferenciaci kandid např. Lehmann *et al.* (1992). Výsledkem PCR, při použití jednoho ze čtyř zvolených primerů o délce 10 bp, byla charakteristická a reprodukovatelná sada produktů pro *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* a *C. glabrata*. Na jediném agarózovém gelu bylo možno pozorovat podstatné rozdíly v jejich fingerprintech. Počet a velikost jednotlivých fragmentů DNA byly pro uvedené druhy charakteristické. Autoři tak dokumentovali použití RAPD jako efektivního a jednoduchého nástroje pro rychlou identifikaci patogenních druhů kvasinek.

Thanos *et al.* (1996) provedli identifikaci 60 sbírkových a klinických izolátů, zahrnujících 26 různých druhů kandid a sedm dalších rodů kvasinek. Každý vzorek DNA byl amplifikován ve čtyřech samostatných PCR s využitím jednoho z následujících primerů: AP3, o náhodně zvolené sekvenci, T3B, odvozeného z oblasti

mezi geny pro transferovou RNA a dvou mikrosatelitových (GTG)₅, resp. (AC)₁₀. Jejich rozlišovací schopnost byla údajně téměř shodná. Pomocí RAPD vznikly produkty, které byly svým počtem a délkou charakteristické pro všechny analyzované druhy. Porovnáním fingerprintů klinických izolátů s typovými kmeny mohly být identifikovány také druhy, u nichž selhala běžná biochemická diferenciaci.

Pomocí RAPD s náhodným primerem 5'-ACGGGCCAGT-3', který navrhli Liu *et al.* (1996), byl analyzován soubor 18 izolátů sedmi druhů kandid, doplněný o 5 kultur dermatofyt. Po elektroforetické separaci produktů vznikly jedinečné DNA fingerprinty, jež umožnily rychlou a přesnou identifikaci *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. tropicalis* a *C. glabrata*.

Steffan *et al.* (1997) optimalizovali RAPD s jedním z deseti primerů o náhodně zvolených sekvencích, jejímž výsledkem byly pro analyzované izoláty *C. albicans*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa* a *C. tropicalis* unikátní fingerprinty. Správná identifikace byla dokumentována u více než 98 % izolátů, určených na CHROMagaru Candida jako non-*albicans* druhy. Výsledky u 91 % z celkového počtu studovaných kultur byly v souladu s výsledky asimilačních profilů, získaných soupravou API 20 C AUX. Autoři závěrem konstatovali, že použitím RAPD byla významně zvýšena spolehlivost a rozlišovací schopnost identifikace kvasinek.

Pinto *et al.* (2004) se zabývali diferenciací 37 izolátů druhů *C. albicans* a *C. guilliermondii* od 11 HIV (virus lidské imunodeficience) pozitivních pacientů. Při amplifikacích bylo použito celkem devět primerů. Některé z nich dobře diferencovaly na úroveň druhu, jiné byly lépe využitelné při typizaci.

Baires-Varguez *et al.* (2007) hodnotili výsledky identifikace 92 klinických izolátů 12 druhů kandid, získané pomocí soupravy ID 32 C a RAPD s primerem OPE-18 (5' GGACTGCAGA-3'). Bylo zjištěno, že zmíněná genetická metoda měla vysokou rozlišovací schopnost pro druhy kandid, nejčastěji se vyskytující v klinickém materiálu. Pomocí RAPD bylo správně určeno 84 izolátů (91 %), biochemicky všech 92 (100 %). Autoři zjistili 100% senzitivitu RAPD u *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. pelliculosa*, *C. krusei* a *C. lusitaniae*, zatímco u *C. kefyr* a *C. parapsilosis* dosahovala pouze 87, resp. 62 %. Specifita byla 100% u *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr* a *C. parapsilosis*, u *C. krusei*, *C. lusitaniae* a *C. albicans* dosahovala 98, 97, resp. 96 %. Získané RAPD fingerprinty byly navíc tvořeny několika druhově unikátními fragmenty.

Mezi publikovanými kazuistikami o mykotických infekcích, způsobených druhy analyzovanými v naší studii, byla nalezena pouze jedna práce (Baires-Varguez *et al.*, 2007), v níž byla pomocí RAPD identifikována *C. pelliculosa*. Do studovaného souboru byl však zařazen jediný izolát tohoto druhu. Studie, které by využily uvedenou metodu k rozlišení *C. fabianii* nebo *C. utilis*, nebyly v literárních databázích nalezeny. Na základě této skutečnosti se lze domnívat, že naše studie byla první, kterou byly RAPD rozlišovány větší soubory těchto druhů. Dále, s námi použitým primerem byla provedena pouze jedna studie, ve které byly identifikovány lékařsky významné druhy kvasinek (Liu *et al.*, 1996), avšak nebyla do ní zahrnuta ani jedna z námi studovaných kandid.

6.2.3 Možnosti a limity McRAPD

Plachý *et al.* (2005) i Trtková *et al.* (2009) shodně konstatovali, že je McRAPD při porovnání s klasickou RAPD rychlejší, méně pracná a ekonomičtější. Porovnávání fingerprintů v gelu je nahrazeno prací s číselnými daty, které jsou zpracovávány nezávislou automatizovanou analýzou. Detekce poklesu fluorescence trvá jen několik minut, na rozdíl od 2,5 h probíhající gelové elektroforézy. Z uvedených důvodů má tato technika předpoklady pro automatizaci a komerční využití.

Daší výhodou, která minimalizuje možnost kontaminace vyšetřované DNA, je průběh reakce (tání) ve stejné kapiláře, ve které byla provedena PCR. V naší studii však byla McRAPD provedena v termocykleru, jehož součástí přístroj na analýzu tání nebyl, přesto nebyla kontaminace zjištěna. Na druhé straně byla použitím samostatného přístroje získána kvalitní data, umožňující konstrukci křivek tání s velmi dobrým druhovým rozlišením.

Významnou roli v celém procesu McRAPD hraje kvalita DNA. Pokud by nebylo získáno dostatečné množství čisté templátové DNA, mohlo by dojít k falešným amplifikacím. V naší studii se osvědčila izolace DNA z lyzátů jednotlivých kolonií pomocí upravené tzv. párátkové techniky, která byla popsána a optimalizována Steffanem *et al.* (1997).

Opakovaným testováním byly dosaženy vysoce reprodukovatelné křivky tání s nízkou variabilitou, čímž byla ověřena intralaboratorní reprodukovatelnost McRAPD.

6.2.4 Porovnání identifikace McRAPD a ID 32 C

Na základě výsledků naší studie lze konstatovat, že McRAPD je při identifikaci kvasinek spolehlivější než fenotypové metody, které jsou navíc časově náročnější a mnohdy nevedou ke zcela jednoznačným výsledkům.

Ve studii byly porovnány výsledky diferenciací tří druhů kandid, geneticky McRAPD a biochemicky asimilační soupravou ID 32 C. Obě metody byly použity u souboru 61 kultur, složeného z klinických izolátů, typových a sbírkových kmenů. Výsledky identifikace byly totožné pouze u deseti z nich, po pěti *C. pelliculosa* a *C. utilis*. Příčinou neshod byla absence *C. fabianii* v databázi programu Apiweb, z tohoto důvodu jí nebylo možno správně určit 51 kultur, které McRAPD jednoznačně identifikovala jako zástupce uvedeného druhu.

Je nutno brát v úvahu, že amplifikace byla prováděna pouze s jediným primerem, jehož dobrá rozlišovací schopnost pro testované tři druhy kandid byla touto studií jednoznačně dokumentována. Není však jisté, má-li zmíněný primer dostatečný potenciál pro identifikaci všech lékařsky významných druhů kvasinek. V budoucnu by proto bylo vhodné pro tento účel testovat a poté vybrat několik dalších primerů.

Předností McRAPD je i použití menšího množství hmoty kultury, což by mohlo být výhodou při provádění identifikace z primokultur. Pro uvedenou techniku je dostačující desetina hmoty jediné kolonie, zatímco ID 32 C vyžaduje suspenzi dvou až tří.

Významný rozdíl mezi oběma metodami byl prokázán také v časovém intervalu, potřebném ke získání výsledků. Souprava ID 32 C byla hodnocena po 48 a 72 h, u McRAPD trvala izolace DNA 40 min, následná diferenciací PCR a analýzou tání byla dokončena během dalších 3,5 h.

Při porovnávání ekonomické náročnosti obou metod je nutno zmínit, že McRAPD, na rozdíl od ID 32 C, vyžaduje nákladné přístrojové vybavení (termocykler a analyzátor tání nebo termocykler se zabudovaným melterem). Lze však předpokládat, že v budoucnu se tyto přístroje stanou běžnou součástí vybavení moderních laboratoří. Z hlediska nákladů na spotřební materiál je provozní cena reakcí McRAPD plně srovnatelná s identifikací soupravou ID 32 C.

7 Závěry

Identifikace kvasinek je významnou součástí mykologické laboratorní diagnostiky, protože některé druhy jsou známé rezistencí k určitým antimykotikům. Důsledkem je pak nutnost neprodleně změnit léčebnou strategii. Určování kvasinek pro potřeby klinické praxe proto vyžaduje rychlost a přesnost. Tradiční morfologické a biochemické metody jsou sice při identifikaci většiny lékařsky významných kvasinek spolehlivé, ale vzájemné odlišení některých vzácnějších druhů je obtížné, jiné jsou tímto způsobem dokonce chybně identifikovány. Významný přínos zde představují pro svoji rychlost a přesnost techniky zaměřené na analýzy nukleových kyselin, metodiky jsou však stále ve vývoji a žádná zatím nebyla široce akceptována jako standardní. Než k tomu dojde, je třeba jejich spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků ověřovat formou laboratorních studií.

V tomto směru je přínosem i předkládaná diplomová práce, která ověřovala využitelnost genetické techniky McRAPD při vzájemném rozlišování druhů *C. fabianii*, *C. pelliculosa* a *C. utilis*. Jak je přesvědčivě dokumentováno ve výsledkové části, za použití zvolených parametrů PCR, představuje metoda kvalitní nástroj jejich diferenciaci, kterým je možno ověřovat identifikaci biochemickými testy.

Na základě výsledků demonstrováných v této práci lze dále učinit následující závěry:

1. McRAPD je metoda s vysokou reprodukovatelností, neboť opakovaným testováním byly dosaženy téměř identické křivky tání. V rámci zkoumaných druhů bylo navíc rozlišeno několik odlišných genotypů, což naznačuje potenciál metody i pro vnitrodruhovou typizaci.
2. Vizualní analýza křivek tání umožnila na základě charakteristických profilů jednoznačnou druhovou identifikaci izolátů. Použitelnost metody v diagnostické praxi klinických laboratoří tak omezují pouze náklady na přístrojové vybavení.
3. Pomocí McRAPD byl spolehlivě diferencován rozsáhlý soubor 46 klinických izolátů *C. fabianii*. Tím bylo prokázáno, že se uvedený druh ve vzorcích, získaných od pacientů, vyskytuje s významně vyšší frekvencí než *C. pelliculosa* a *C. utilis*. Na rozdíl od něj jsou však oba zařazeny do databází řady komerčních biochemických souprav k identifikaci kvasinek. Z uvedené skutečnosti vyplývá nezbytnost databáze v tomto smyslu aktualizovat.

8 Seznam použitých zkratek

%id	procentuální pravděpodobnost druhové identifikace
AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů
bp	páry bází
CBS	sbírka Centraalbureau voor Schimmelcultures
CCY	sbírka Culture Collection of Yeasts
cDNA	komplementární DNA
dH₂O	destilovaná voda
dNTPs	deoxyribonukleotid trifosfáty
dsDNA	dvojvláknová DNA
DTT	dithiothreitol
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina
EIA	enzymová imunoanalýza
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
ITS	vnitřní transkribované prostory
JCM	sbírka Japan Collection of Microorganisms
McRAPD	Melting curve of Random Amplified Polymorphic DNA
NASBA	amplifikace specifických sekvencí RNA
PCR	polymerázová řetězová reakce
PNA	peptide nucleic acid
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RAPD	náhodná amplifikace polymorfní DNA
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů
rRNA	ribosomální RNA
SDA	Sabouraudův dextrózový agar
SSCP	konformační polymorfismus jednovláknové DNA
T_M	teplota tání

9 Použitá literatura

- Ahearn, D.G.** (1998): Yeast pathogenic for humans. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (eds.): The yeasts, a taxonomic study, pp. 9 - 12, Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Ahmad, S., Khan, Z., Mustafa, A.S., Khan, Z.U.** (2002): Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2483 - 2489.
- Alsina, A., Mason, M., Uphoff, R.A., Riggsby, W.S., Becker, J.M., Murphy, D.** (1988): Catheter-associated *Candida utilis* fungemia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: species verification with a molecular probe. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 621 - 624.
- Atkinson, B.J., Lewis, R.E., Kontoyiannis, D.P.** (2008): *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Medical Mycology*, 46: 541 - 546.
- Baires-Varguez, L., Cruz-García, A., Villa-Tanaka, L., Sánchez-García, S., Gaitán-Cepeda, L.A., Sánchez-Vargas, L.O., Quindós, G., Hernández Rodríguez, C.** (2007): Comparison of a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and ATB ID 32 C system for identification of clinical isolates of different *Candida* species. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 148 - 151.
- Bakir, M., Çerikcioğlu, N., Tirtir, A., Berrak, S., Özek, E., Canpolat, C.** (2004): *Pichia anomala* fungaemia in immunocompromised children. *Mycoses*: 47: 231 - 235.
- Ball, L.M., Bes, M.A., Theelen, B., Bockhout, T., Egeler, R.M., Kuijper, E.J.** (2004): Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 1673 - 1679.
- Bhally, H.S., Jain, S., Shields, C., Halsey, N., Cristofalo, E., Merz, W.G.** (2006): Infection in a neonate caused by *Pichia fabianii*: importance of molecular identification. *Medical Mycology*, 44: 185 - 187.

- Bougnoux, M.E., Dupont, C., Mateo, J., Saulnier, P., Faivre, V., Payen, D., Nicolas-Chanoine, M.H.** (1999): Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 925 - 930.
- Bougnoux, M.E., Gueho, E., Potocka, A.C.** (1993): Resolutive *Candida utilis* fungemia in a nonneutropenic patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1644 - 1645.
- Bruun, B., Westh, H., Stenderup, J.** (1995): Evaluation of the ATB 32C system for identification of clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 1: 134 - 138.
- Bu, R., Sathiapalan, R.K., Ibrahim, M.M., Al-Mohsen, I., Almodavar, E., Gutierrez, M.I., Bhatia, K.** (2005): Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 243 - 248.
- Burgener-Kairuz, P., Zuber, J.P., Jaunin, P., Buchman, T.G., Bille, J., Rossier, M.** (1994): 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- α -demethylase (L1A1) gene fragment. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1902 - 1907.
- Compton, J.** (1991): Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 350: 91 - 92.
- Crampin, A.C., Matthews, R.C.** (1993): Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment. *Journal of Medical Microbiology*, 39: 233 - 238.
- Dembry, L.M., Vazques, J.A., Zervos, M.J.** (1994): DNA analysis in the study of the epidemiology of nosocomial candidiasis. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 15: 48 - 53.
- Dendis, M., Horvath, R., Michalek, J., Ruzicka, F., Grijalva, M., Bartos, M., Benedik, J.** (2003): PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clinical Microbiology and Infection*, 9: 1191 - 1202.
- Dooley, D.P., Beckius, M.L., McAllister, C.K., Jeffery, B.S.** (1990): Prostatitis caused by *Hansenula fabianii*. *Journal of Infectious Diseases*, 161: 1040 - 1041.

- Elie, C.M., Lott, T.J., Reiss, E., Morrison, C.J.** (1998): Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 3260 - 3265.
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill III F.R., Smith, T.F.** (2006): Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 165 - 256.
- Fanello, S., Bouchara, J.P., Sauteron, M., Delbos, V., Parot, E., Marot-Leblond, A., Moalic, E., Le Flohic, A.M., Brangerd, B.** (2006): Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 223 - 228.
- Fragner, P.** (1992): *Určování kvasinek izolovaných z lidského organismu*, Academia, Praha.
- Freydiere, A.M., Guinet, R., Boiron, P.** (2001): Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Medical Mycology*: 39: 9 - 33.
- Fricke-Hidalgo, H., Vandapel, O., Duchesne, M.A., Mazoyer, M.A., Monget, D., Lardy, B., Lebeau, B., Freney, J., Ambroise-Thomas, P., Grillot, R.** (1996): Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 1846 - 1848.
- Fridkin, S.K.** (2005): The changing face of fungal infections in health care settings. *Clinical Infectious Diseases*, 41: 1455 - 1460.
- Fujita, S.I., Lasker, B.A., Lott, T.J., Reiss, E., Morrison, C.J.** (1995): Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 962 - 967.
- Fujita, S.I., Senda, Y., Nakaguchi, S., Hashimoto, T.** (2001): Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3617 - 3622.
- Gharizadeh, B., Norberg, E., Löffler, J., Jalal, S., Tollemar, J., Einsele, H., Klingspor, L.** (2004): Identification of medically important fungi by the pyrosequencing technology. *Mycoses*, 47: 29 - 33.
- Gutierrez, J., Martin, E., Lozano, C., Coronilla, J., Nogales, C.** (1994): Evaluation of the ATB 32C, Automicrobic system and API 20C using clinical yeast isolates. *Annales de Biologie Clinique*, 50: 443 - 446.

- Hall, L., Wohlfel, S., Roberts, G.D.** (2003): Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 5099 - 5102.
- Hamal, P.** (2007): Molekulárně genetické metody v lékařské mykologii: současný stav a perspektivy. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství*, 13: 136 - 144.
- Hamal, P., Ostransky, J., Dendis, M., Horvath, R., Ruzicka, P., Buchta, V., Vejsova, M., Sauer, P., Hejnar, P., Raclavsky, V.** (2008): 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. *Medical Mycology*, 46: 601 - 605.
- Hamal, P., Trtková, J., Raclavský, V.** (2005): Molekulární epidemiologie aspergilóz a kandidóz: přehled a vlastní zkušenosti. *Správy Klinickéj Mikrobiologie*, 5: 64 - 68.
- Hazen, K.C., Theisz, G.W., Howell, S.A.** (1999): Chronic urinary tract infection due to *Candida utilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 824 - 827.
- Heelan, J.S., Siliezar, D., Coon, K.** (1996): Comparison of rapid testing methods for enzyme production with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 2847 - 2849.
- Hsu, M.C., Chen, K.W., Lo, H.J., Chen, Y.C., Liao, M.H., Lin, Y.H., Li, S.Y.** (2003): Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 52: 1071 - 1076.
- Hui, M., Ip, M., Chan, P.K.S., Chin, M.L., Cheng, A.F.B.** (2000): Rapid identification of medically important *Candida* to species level by polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 38: 95 - 99.
- Chakrabarti, A., Singh, K., Narang, A., Singhi, S., Batra, R., Rao, K.L.N., Ray, P., Gopalan, S., Das, S., Gupta, V., Gupta, A.K., Bose, S.M., McNeil, M.M.** (2001): Outbreak of *Pichia anomala* infection in the pediatric service of a tertiary-care center in Northern India. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 1702 - 1706.
- Chang, H.C., Leaw, S.N., Huang, A.H., Wu, T.L., Chang, T.C.** (2001): Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3466 - 3471.

- Kan, V.L.** (1993): Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidaemia. *The Journal of Infectious Diseases*, 168: 779 - 783.
- Kanbe, T., Horii, T., Arishima, T., Ozeki, M., Kikuchi, A.** (2002): PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast*, 19: 973 - 989.
- Khandka, D.K., Tuna, M., Tal, M., Nejjdat, A., Golan-Goldhirsh, A.** (1997): Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. *Electrophoresis*, 18: 2852 - 2856.
- Kumar, M., Shukla, P.K.** (2006): Single-stranded conformation polymorphism of large subunit of ribosomal RNA is best suited to diagnosing fungal infections and differentiating fungi at species level. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56: 45 - 51.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W.** (1998): *The yeasts, a taxonomic study*, Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., Basehoar-Powers, E.** (2008): Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Research*, 8: 939 - 954.
- Land, G.A., Vinton, E.C., Adcock, G.B., Hopkins, J.M.** (1975): Improved auxanographic method for yeast assimilations: a comparison with other approaches. *Journal of Clinical Microbiology*, 2: 206 - 217.
- Lehmann, P.F., Lin, D., Lasker, B.A.** (1992): Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 3249 - 3254.
- Leinberger, D.M., Schumacher, U., Autenrieth, I.B., Bachmann, T.T.** (2005): Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 4943 - 4953.
- Lin, C.C.S., Fung, D.Y.C.** (1987): Conventional and rapid methods for yeast identification. *Critical Reviews in Microbiology*, 14: 273 - 289.

- Lindsley, M.D., Hurst, S.F., Iqbal, N.J., Morrison, C.J.** (2001): Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3505 - 3511.
- Liu, D., Coloe, S., Jones, S.L., Baird, R., Pedersen, J.** (1996): Genetic speciation of *Candida* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Letters*, 145: 23 - 26.
- Loeffler, J., Dorn, C., Hebart, H., Cox, P., Magga, S., Einsele, H.** (2003): Development and evaluation of the Nuclisens Basic Kit NASBA for the detection of RNA from *Candida* species frequently resistant to antifungal drugs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 45: 217 - 220.
- Mackay, I.M.** (2004): Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 190 - 212.
- McGinnis, M.R.** (1980): *Laboratory handbook of medical mycology*, Academic Press Inc., New York.
- Meunier, J.R., Grimont, P.A.** (1993): Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology*, 144: 373 - 379.
- Momani, O.M.** (2000): Cost-effectiveness and efficacy of CHROMagar *Candida* medium in clinical specimens. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 6: 968 - 978.
- Nohinek, B., Zee-Cheng, C., Barnes, W.G., Dall, L., Gibbs, H.R.** (1987): Infective endocarditis of a bicuspid aortic valve caused by *Hansenula anomala*. *The American Journal of Medicine*, 82: 165 - 168.
- Nucci, M., Anaissie, E.** (2001): Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clinical Infectious Diseases*, 33: 1959 - 1967.
- Pasqualotto, A.C., Sukiennik, T.C.T., Severo, L.C., Soares de Amorim, C., Colombo, A.L.** (2005): An outbreak of *Pichia anomala* fungemia in a Brazilian pediatric intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 26: 553 - 558.
- Penner, G.A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S.J., Fedak, G.** (1993): Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods and Applications*, 2: 341 - 345.

- Pfaller, M.A., Diekema, D.J.** (2002): Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3551 - 3557.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J.** (2007): Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20: 133 - 163.
- Pincus, D.H., Orega, S., Chatellier, S.** (2007): Yeast identification-past, present and future methods. *Medical Mycology*, 45: 97 - 121.
- Pinto, P.M., Resende, M.A., Koga-Ito, C.Y., Tendler, M.** (2004): Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates using random amplified polymorphic DNA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 147 - 152.
- Plachý, R., Hamal, P., Raclavský, V.** (2005): McRAPD as a new approach to rapid and accurate identification of pathogenic yeasts. *Journal of Microbiological Methods*, 60: 107 - 113.
- Power, E.G.M.** (1996): RAPD typing in microbiology-a technical review. *Journal of Hospital Infection*, 34: 247 - 265.
- Ramani, R., Gromadzki, S., Pincus, D.H., Salkin, I.F., Chaturvedi, V.** (1998): Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 3396 - 3398.
- Rambach, A.** (1995): Method for the identification of microorganisms with a carbohydrate-supplemented medium. Patent FR2708285.
- Reiss, E., Tanaka, K., Bruker, G., Chazalet, V., Coleman, D., Debeaupuis, J.P., Hanazawa, R., Latgé, J.P., Lortholary, J., Makimura, K., Morrison, C.J., Murayama, S.Y., Naoe, S., Paris, S., Sarfati, J., Shibuya, K., Sullivan, D., Uchida, K., Yamaguchi, H.** (1998): Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infectious. *Medical Mycology*, 36: 249 - 257.
- Sandven, P.** (2000): Epidemiology of candidemia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17: 73 - 81.
- Soll, D.R.** (2000): The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 332 - 370.
- Steffan, P., Vasquez, J.A., Boikov, D., Xu, C., Sobel, J.D., Akins, R.A.** (1997): Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2031 - 2039.

- Stockman, L., Roberts, G.** (1985): Rapid screening method for the identification of *Candida glabrata*. Abstract F-80, p. 377. In: Abstracts of the 85th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Las Vegas, 1985; American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Sullivan, D.J., Henman, M.C., Moran, G.P., O'Neill, L.C., Bennett, D.E., Shanley, D.B., Coleman, D.C.** (1996): Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *Journal Medical Microbiology*, 44: 399 - 408.
- Taschdjian, C.L., Burchall, J.J., Kozinn, P.J.** (1960): Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *A.M.A. Journal of Diseases of Children*, 99: 212 - 215.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A.R., Maiden, M.C.J., Odds, F.C.** (2005): *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 284 - 292.
- Taylor, J.W., Geiser, D.M., Burt, A., Koufopanou, V.** (1999): The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 126 - 146.
- Thanos, M., Schönian, G., Meyer, W., Schweynoch, C., Gräser, Y., Mitchell, T.G., Presber, W., Tietz, H.J.** (1996): Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 615 - 621.
- Thuler, L.C.S., Faivichenco, S., Velasco, E., Martins, C.A., Nascimento, C.R.G., Castilho, I.** (1997): Fungaemia caused by *Hansenula anomala*-an outbreak in a cancer hospital. *Mycoses*, 40: 193 - 196.
- Trick, W.E., Fridkin, S.K., Edwards, J.R., Hajjeh, R.A., Gaynes, R.P. and the National Nosocomial Infectious Surveillance System Hospitals** (2002): Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989 - 1999. *Clinical Infectious Diseases*, 35: 627 - 630.
- Trtkova, J., Pavlicek, P., Ruskova, L., Hamal, P., Koukalova, D., Raclavsky, V.** (2009): Performance of optimized McRAPD in identification of 9 yeast species frequently isolated from patient samples: potential for automation. *BioMed Central Microbiology*, 9: 234.
- Trtkova, J., Raclavsky, V.** (2006): Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czech Republic*, 150: 51 - 61.

- Valenza, G., Valenza, R., Brederlau, J., Frosch, M., Kurzai, O.** (2006): Identification of *Candida fabianii* as a cause of lethal septicaemia. *Mycoses*, 49: 331 - 334.
- Warnock, D.W.** (2007): Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 48: 1 - 12.
- White, P.L., Shetty, A., Barnes, R.A.** (2003): Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *Journal of Medical Microbiology*, 52: 229 - 238.
- Wickerham, L.J., Burton, K.A.** (1948): Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *Journal of Bacteriology*, 56: 363 - 371.
- Wilson, D.A., Joyce, M.J., Hall, L.S., Reller, L.B., Roberts, G.D., Hall, G.S., Alexander, B.D., Procop, G.W.** (2005): Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 2909 - 2912.