

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

Optimalizace nested PCR pro detekci kandidové DNA
v klinickém vzorku

(Diplomová práce)

Hradec Králové, 2006

Erika Kvasničková

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce MUDr. Vladislavu Raclavskému, Ph.D. za cenné rady a podněty, které mi při práci poskytl; doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc. za poskytnuté konzultace; Mgr. Jiřímu Pavlíčkovi a Ing. Jitce Trtkové za pomoc při provádění experimentů. Dále děkuji firmě Genetica, jmenovitě dr. Fišerovi, za zapůjčení přístroje RotorGene 3000.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala na Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci samostatně pod vedením MUDr. Vladislava Raclavského, Ph.D..

V Olomouci 1.5.2006

Evta Kvasnickova
.....

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	7
ÚVOD	9
TEORETICKÁ ČÁST.....	11
KVASINKY RODU CANDIDA A JEJICH VÝZNAM V LÉKAŘSTVÍ	11
EPIDEMIOLOGIE KANDIDÓZ.....	12
TERAPIE KANDIDÓZ	13
DIAGNOSTIKA.....	15
<i>Kultivační metody</i>	15
<i>Nekultivační metody</i>	16
<i>Metody molekulární biologie založené na PCR</i>	17
Princip PCR.....	18
Provedení PCR	19
Detekce produktu a druhová identifikace	21
Parametry PCR a jejich optimalizace	22
Získání templátové DNA.....	24
Stanovení koncentrace a čistoty vyizolované nukleové kyseliny	25
Nested PCR	26
Využití nested PCR v diagnostice kandidózy.....	27
Kvantitativní PCR v reálném čase.....	29
<i>Ostatní metody molekulární biologie</i>	31
CÍL PRÁCE	33
MATERIÁL A METODIKA.....	34
MIKROORGANISMY	34
CHEMIKÁLIE	34
POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	35
ZÍSKÁVÁNÍ TEMPLÁTOVÉ DNA	35
<i>Kultivace kvasinek v tekutém médiu</i>	35
<i>Izolace DNA fenol-chloroformovou metodou</i>	36

	5
<i>Purifikace DNA pomocí DNA Lego kitu.....</i>	<i>37</i>
<i>Izolace DNA pomocí YeaStar Genomic DNA Kit.....</i>	<i>38</i>
<i>Určení koncentrace DNA.....</i>	<i>38</i>
TOOTHPICK PCR.....	39
PŘÍPRAVA PCR SMĚSI.....	39
<i>Příprava ředící řady templátové DNA.....</i>	<i>39</i>
<i>Primery.....</i>	<i>40</i>
<i>Sestavení Mastermixu.....</i>	<i>41</i>
<i>Sestavení PCR směsi.....</i>	<i>43</i>
PCR AMPLIFIKACE.....	44
<i>Optimalizace podmínek nested PCR.....</i>	<i>45</i>
PCR enhancer.....	46
Optimalizace objemu PCR směsi v 2. kole u nested PCR v jedné zkumavce.....	46
<i>Hodnocení specifity nested PCR.....</i>	<i>46</i>
ELEKTROFORÉZA.....	47
<i>Příprava gelu.....</i>	<i>47</i>
<i>Nanášení produktů PCR na gel.....</i>	<i>47</i>
<i>Hodnocení elektroforézy a velikosti amplifikovaných DNA fragmentů.....</i>	<i>47</i>
VÝSLEDKY A DISKUZE.....	49
POUŽITÍ PCR ENHANCERU.....	49
OPTIMALIZACE PODMÍNEK NESTED PCR.....	50
<i>Optimalizace podmínek 1. kola.....</i>	<i>50</i>
<i>Optimalizace podmínek 2. kola.....</i>	<i>53</i>
Citlivost nested PCR po optimalizaci.....	55
Specifita optimalizované nested PCR pro druh <i>Candida albicans</i>	56
NESTED PCR V JEDNÉ ZKUMAVCE.....	57
<i>Citlivost nested PCR v jedné zkumavce - tradičně optimalizované podmínky pro vyšší citlivost vs. podmínky zajišťující vysokou specifitu.....</i>	<i>61</i>
<i>Specifita nested PCR v jedné zkumavce - optimalizované vs. původní podmínky.....</i>	<i>63</i>
<i>Citlivost nested PCR v jedné zkumavce s fosforylovanými a nefosforylovanými vnitřními primery.....</i>	<i>65</i>

	6
TOOTHPICK PCR.....	68
VYUŽITELNOST VÝSLEDKŮ	70
ZÁVĚR.....	73
LITERATURA.....	74
PŘÍLOHY	78
PŘÍLOHA 1 - SEZNAM OBRÁZKŮ	78
PŘÍLOHA 2 - SEZNAM TABULEK	79

Seznam použitých zkratk a symbolů

A, C, G, T	... adenin, cytosin, guanin, thymin
bp	... páry bází (<i>angl.</i> base pairs)
cDNA	... komplementární DNA
dATP	... deoxyadenosintrifosfát
dCTP	... deoxycytidintrifosfát
ddH ₂ O	... dvakrát destilovaná voda
dGTP	... deoxyguanosintrifosfát
DMSO	... dimethylsulfoxid
DNA	... deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	... deoxynukleosidtrifosfáty
dsDNA	... dvouvláknová DNA (<i>angl.</i> double-stranded DNA)
dTTP	... deoxythymidintrifosfát
dUTP	... deoxyuridintrifosfát
EDTA	... ethylendiaminotetraoctová kyselina
ELISA	... enzymová imunosorbční analýza (<i>angl.</i> enzyme linked immunosorbent assay)
eppi	... zkumavka typu Eppendorf
EtBr	... ethidium bromid
ITS	... <i>angl.</i> internal transcribed spacer
Mx	... <i>angl.</i> master mix
NASBA	... <i>angl.</i> nucleic acid sequence-based amplification
PCR	... polymerázová řetězová reakce (<i>angl.</i> polymerase chain reaction)
RAPD	... náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (<i>angl.</i> random amplified polymorphic DNA)
REA	... restrikční enzymová analýza

RFLP	... délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (<i>angl.</i> restriction fragment length polymorphism)
RNA	... ribonukleová kyselina
rRNA	... ribozomální RNA
S	... Svedbergova sedimentační konstanta
SSCP	... konformační polymorfismus jednovláknové DNA (<i>angl.</i> single-strand conformation polymorphism)
ssDNA	... jednovláknová DNA (<i>angl.</i> single-stranded DNA)
TBE pufr	... Tris/borát/EDTA pufr
TE pufr	... Tris/EDTA pufr
T_m	... teplota tání (<i>angl.</i> melting temperature)
Tris	... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	... jednotka enzymové aktivity (<i>angl.</i> unit)
YPD	... tekuté živné médium (1 % kvasničný extrakt, 1 % pepton a 1 % dextróza)
YPG	... tekuté živné médium (1 % kvasničný extrakt, 1 % pepton a 1 % glukóza)

Úvod

Infekce způsobené kvasinkami rodu *Candida* tzv. kandidózy zůstávají důležitým klinickým problémem. Za poslední desetiletí se jejich výskyt signifikantně zvýšil, především vzrostl počet nozokomiálních nákaz. Rod *Candida* obsahuje několik zástupců, kteří se projevují jako oportunní patogeni. Jsou běžnou součástí mikroflóry člověka, vyskytují se i v prostředí, a zejména u jedinců s oslabenou obranyschopností mohou způsobit závažné onemocnění. Dostanou-li se kvasinky do krve, mohou se šířit do vnitřních orgánů a způsobit systémovou kandidózu. Systémová kandidóza je velmi závažné onemocnění s mortalitou nejméně 35%. V případě správné diagnózy v raných stádiích infekce a včasné antifungální terapie se její prognóza dramaticky lepší.

V poslední době poklesla incidence mykotických infekcí způsobených kvasinkou *Candida albicans*, úměrně k tomu vzrostl výskyt infekcí způsobených jinými tzv. non-albicans druhy kandid, které však vykazují nižší citlivost k antifungálním látkám, např. flukonazolu. Jako důsledek tohoto epidemiologického posunu je třeba rychlá identifikace vyvolávajícího patogena včetně zařazení do druhu, aby mohla být nasazena včasná a efektivní terapie a infekce úspěšně zvládnuta.

K identifikaci kandid jsou používány morfologické, sérologické a biochemické testy. V současnosti se nejvíce používají kultivační a sérologické metody, dále probíhá snaha o zavedení do praxe metod založených na poznacích molekulární biologie, které by mohly představovat jednodušší a výkonnější alternativu ke konvenčním testům, protože citlivost klasických kultivačních metod a histologického vyšetření bioptického materiálu je nedostačující, zvláště v časných stádiích infekce. Také citlivost dalších laboratorních testů založených na detekci *Candida*-specifických protilátek, antigenů nebo metabolitů není uspokojivá. Navíc jsou všechny tyto metody časově náročné a nedokáží často jednoznačně identifikovat druh kvasinky. Především v případech rychlé progresse onemocnění je pak mnohdy nutné nasadit antifungální terapii na základě empirických zkušeností, aniž by byla známa definitivní diagnóza. Tento přístup je finančně nákladný a v případě nepotvrzení diagnózy je pro pacienta zatěžující, navíc významně přispívá k vývoji rezistence těchto patogenů k často používaným antimykotikům.

Použití molekulárně biologických metod nabízí obrovský potenciál k dosažení cíle rychlé druhové identifikace. Na rozdíl od klasických diagnostických metod se zaměřuje na identifikaci druhově specifických segmentů deoxyribonukleové kyseliny a ne na hodnocení fenotypových znaků, které mohou být pro řadu zástupců shodné. Díky své rychlosti, reprodukcibilitě, vysoké citlivosti a specifitě se stále více k laboratorní diagnostice užívá polymerázová řetězová reakce (PCR).

Mezi slibné přístupy patří mimo jiné tzv. uhnížděná (*angl. nested*) PCR. Tato metoda se skládá ze dvou samostatných po sobě následujících amplifikačních kroků, ve kterých je využito dvou odlišných primerových párů k amplifikaci určité specifické oblasti DNA patogena. Tímto přístupem je obecně zvýšena citlivost PCR metodiky.

Výzkum, který se snaží o adaptaci a standartizaci PCR, aby byla více aplikovatelná pro použití v diagnostických laboratořích, pokračuje a předpokládá se, že rychlá, uživatelsky přátelská PCR technologie, která bude rutinně použitelná na zpracování velkých objemů laboratorních vyšetření, není tak vzdálená budoucnost.

Teoretická část

Kvasinky rodu Candida a jejich význam v lékařství

Asexuální formy těchto kvasinek patří do říše hub (Fungi), oddělení Eumycota, třídy Deuteromycetes (Fungi Imperfecti). Jedná se o jednobuněčné eukaryontní mikroorganismy, u kterých jsou jen některé druhy schopny pohlavního rozmnožování pomocí askospor. Pohlavní formy jsou řazeny mezi askomycety (Ascomycota). Většina kandid se obvykle množí nepohlavně pučením z jednobuněčných blastospor. Blastospory mohou být prodloužené, oválné či kulaté, ve velikosti od 2 do 8 μm . Jejich tvar a velikost jsou do určité míry charakteristické pro každý druh. Kandidy se vyskytují kosmopolitně v ovzduší, půdě a jako komenzálové či patogeni teplokrevných zvířat a člověka.

Zástupci rodu *Candida* jsou dnes řazeni k dimorfním houbám, což znamená, že v závislosti na podmínkách prostředí mají některé kandidy jedinečnou schopnost růst ve formě vláknitého pseudomycelia (dceřiné buňky se protahují a neoddělují od mateřské buňky) nebo dokonce pravého mycelia (Buchta et al., 1998).

Ačkoli existuje okolo 150 druhů rodu *Candida*, jen malý počet z nich jsou lidští patogeni, protože přibližně 65% druhů kandid není schopné růst při teplotě 37°C, což je nutnou podmínkou pro to, aby se daná kandida mohla stát úspěšným patogenem. Klasickým a nejčastějším původcem kandidózy je *C. albicans*. Patogenní jsou také další druhy, např. *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* a dále vzácněji se vyskytující *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. viswanathii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. inconspicua* a *C. utilis*. (Calderone, 2002).

Všechny výše jmenované druhy kandid se projevují jako potenciálně patogenní houby. Mají vlastnosti, které jim umožňují být úspěšnými komenzály u zdravého hostitele. Za určitých okolností však dochází ke vzniku a narůstání virulence, projevující se především invazí houby do tkáně.

Kandidóza je nejčastější systémová mykóza v lékařské praxi a v posledních desetiletích počet a závažnost onemocnění nebezpečně narůstá. Patří k mykózám

sekundárním, což znamená, že infekce vzniká u osob oslabených jiným onemocněním a s narušenou imunitou.

Další závažnou skutečností je to, že *Candida albicans* a další druhy tohoto rodu jsou původci nosokomiálních nákaz. Výskyt kandidových nosokomiálních mykóz vzrostl v posledním desetiletí asi o 300%. Dominujícím původcem těchto infekcí je *C. albicans*, ale při arteficiálním zavlečení se uplatňují i další druhy kandid jak patogenních, tak běžně nepatogenních (Bednář et al., 1994).

Epidemiologie kandidóz

Kandidy jsou ubikvitárně se vyskytující mikroorganismy, většina z nich nejsou lidské patogeny, ale vyskytují se jako saprofyti. Řada kandid jsou běžní komenzálové člověka a jejich patogenita se může uplatnit jen v případě, že jsou narušeny imunologické a mechanické obranné mechanismy.

Infekce způsobené kandidami mohou mít lokální nebo systémový charakter. U povrchových kandidóz převládají slizniční formy – orofaryngeální (soor čili moučnivka) a vulvovaginální kandidóza; dále ezofagitida, intertriginózní kandidóza, keratitida a onychomykóza (Ruhnke, 2002). Orální kandidóza se často vyskytuje u nedonošených dětí a je také jednou z manifestací u nemocných AIDS, vulvovaginální kandidóza je častá u gravidních žen a diabetiček (Bednář et al, 1994). Tyto kandidózy jsou sice nepříjemné, ale ne životu nebezpečné. Infekce kůže a sliznic způsobené kvasinkami nacházíme jak u imunokomprimovaných pacientů, tak u lidí s nenarušenou imunitou, což je rozdíl oproti systémovým kandidózám, které se vyskytují prakticky pouze u těžce imunosuprimovaných pacientů (Ruhnke, 2002).

Rozmnožení kandid bývá součástí střevní dysmikrobie s průjmy, způsobené potlačením fyziologické anaerobní flory antibiotiky. Při imunodeficitech T lymfocytů je průvodním znakem chronická mukokutánní kandidóza a rozsáhlým poškozením kůže a sliznic a hlubší invazí kvasinek do tkáně (Bednář et al., 1994).

Nejtěžší formou kandidózy jsou diseminované a orgánové infekce. Houba se šíří hematogenní cestou nebo invazí do tkání a postihuje plíce a bronchy, gastrointestinální trakt, ledviny a další orgány (Bednář et al., 1994). Kandidémie je závažný stav a v případě, že není léčena, dosahuje mortalita 50 až 75%. Rizikové faktory, které

predisponují vznik systémové kandidózy, jsou rakovina a s ní spojená léčba, imunosupresivní terapie po transplantaci orgánů, hematologické malignity, při kterých se vyskytuje neutropenie, chirurgické zákroky v břišní dutině (*C. albicans* je běžnou součástí střevní mikroflóry), infekce HIV, dlouhodobá intubace a intravenózní katetrizace a předchozí léčba širokospektrými antibiotiky (Sullivan and Coleman, 2002).

Jak již bylo řečeno, patogenní druhy kandid jako *C. albicans* jsou často přítomny jako komenzálové lidských hostitelů, proto se domníváme, že většina nosokomiálních kandidóz je endogenního původu. Pacienti již přicházejí do nemocnice s příslušným patogenem jako součástí své přirozené mikroflóry. V případě, že dojde při pobytu v nemocnici k oslabení imunity pacienta, endogenní kmen kandidy může způsobit infekci. Dále je možný přenos patogenního agens ze zdravotnického personálu na pacienty nebo mezi pacienty navzájem. Kvasinky rodu *Candida* se přenášejí velmi snadno a rychle. Jsou to organismy běžně přítomné na kůži rukou a na sliznicích, ve vzduchu v aerosolech, na nemocničních přístrojích a na předmětech denní potřeby (Calderone, 2002).

Výskyt systémové kandidózy u hospitalizovaných pacientů se zdvojnásobil v průběhu dvou posledních desetiletí a kandidy se staly běžnými původci sepsí. Infekce způsobené kandidami představují asi 10 % všech nozokomiálních infekcí, zaujímají pozici za původci z čeledi *Enterobacteriaceae* (28 %), *Staphylococcus aureus* (13 %) a *Pseudomonas* spp. (11 %). Zvyšující se výskyt těchto infekcí je připisován rostoucímu počtu imunokomprimovaných a intenzivně léčených pacientů. Ačkoliv *C. albicans* zůstává stále nejčastějším původcem kandidóz (nacházíme ji v 55 % krevních izolátů), vzrůstá i výskyt ostatních druhů např. *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *C. krusei* (Kullberg and Filler, 2002).

Terapie kandidóz

Terapie se liší podle toho, zda se jedná o povrchovou či systémovou kandidózu. Při léčbě systémových mykóz se používá amphotericin B, který patří mezi polyenová antimykotika, dále zahrnuje tato skupina nystatin a natamycin. Polyenová antimykotika patří k nejstarším z dostupných léčiv. Po perorálním podání se nevstřebávají a po injekční aplikaci jsou značně toxická. K injekční aplikaci je vhodný pouze amphotericin B, avšak terapie je prakticky vždy doprovázena závažnými nežádoucími účinky.

Moderní lékové formy obsahují amphotericin B ve formě koloidních disperzí či lipidových komplexů, což výrazně omezuje jeho závažné nežádoucí účinky.

Ke starším antimykotikům patří rovněž flucytosin, jeho nevýhodou je častý vznik rezistence při monoterapii, významnou klinickou předností je jeho synergický účinek s amphotericinem B, což umožňuje snížit dávku amphotericinu B při současném podávání flucytosinu.

Dále je možné užít triazolová antimykotika (flukonazol, itrakonazol). Jsou dobře tolerována a mají minimum nežádoucích účinků. Jsou účinná i u závažných systémových infekcí způsobených kandidami (Suchopár et al., 1999). V současné době byl zaveden do klinické praxe nový vysoce účinný triazolový preparát vorikonazol. Vorikonazol je indikován jako lék první linie v léčbě kandidové sepse u pacientů bez neutropenie. Je účinný proti *C. albicans* i non-*albicans* druhům kandid. Je možná intravenózní i perorální forma podání (Kale and Johnson, 2005).

Dále se v praxi začal užívat echinokandinový derivát kaspofungin, který je určen k léčbě invazivní kandidózy a aspergilózy u pacientů, kteří nesnáší amphotericin B a azolová antimykotika (AISLP 2005.4). V klinické fázi zkoušení jsou i další léky - zástupci triazolových antimykotik posakonazol a ravukonazol, echinokandinové deriváty anidulafungin a micafungin, antifungální peptidy odlišné struktury než echinokandiny a sordarinové deriváty (Arikan and Rex, 2002).

K terapii lokálních mykóz způsobených kandidami se nejčastěji používají imidazolová antimykotika (clotrimazol, econazol, ketoconazol, miconazol atd.), polyenová antimykotika natamycin a nystatin, dále amorolfin a ciclopirox v různých topických lékových formách.

K léčbě povrchových kandidóz se dále používá terbinafin, což je novější allylaminové antimykotikum se širokým antifungálním spektrem, má však poněkud nižší účinnost na kvasinky. Při podání per os dosahuje účinných koncentrací pouze v kůži a jejích adnexech, a proto je jeho použití omezeno na terapii mykotických infekcí kůže a nehtů. Mezi allylaminová antimykotika patří rovněž naftifin (Suchopár et al., 1999).

Systémové mykotické infekce jsou vždy závažné, proto je nutné okamžité nasazení léčby. Během léčby a profylaktického podávání širokospektrých antimykotik

se u mnoha kmenů po čase vyvinula rezistence. Důsledkem narůstající rezistence je pak zvýšená mortalita těchto nozokomiálních infekcí. Pro správnou volbu účinné léčby je nutná rychlá detekce kandidózy a druhová identifikace původců infekce (Masterton et al., 2003).

Diagnostika

Pokud je diagnóza systémové kandidózy potvrzena v časně fázi infekce a anti-fungální terapie je zahájena včas, prognóza onemocnění může být dramaticky vylepšena. Bohužel klinické manifestace kandidózy se neliší od sepse způsobené jinými mikroorganismy a citlivost v současné době rutinně používaných kultivačních metod je relativně nízká, zvláště v časných stádiích infekce. Trvá 2 až 5 dnů a často i déle, než je možné přistoupit k identifikaci kvasinky. Časová náročnost je způsobena pomalým růstem kvasinek, v mnoha případech mohou být původci nekultivovatelní nebo přítomni v odebraném vzorku jen ve velmi malém množství.

Výše vyjmenované problémy jsou důvodem, proč je řada případů systémové kandidózy diagnostikována příliš pozdě na záchranu pacienta a některé případy jsou diagnostikovány až post mortem. Proto se v případě rychle progredující nemoci často nasazuje antifungální terapie empiricky předtím, než je stanovena definitivní diagnóza. Tento přístup je finančně nákladný a zvyšuje riziko vývoje rezistence kandid k běžně používaným antimykotikům a v případě nepotvrzení diagnózy kandidózy zbytečně zatěžuje pacienta.

Aby byl snížen čas potřebný k diagnóze a identifikaci původců infekce a tím snížena mortalita spojená se systémovou kandidózou, bylo vyvinuto množství odlišných přístupů, každý má své výhody a nevýhody. Mezi nejslibnější přístupy patří metody molekulární biologie, které umožňují detekovat specifické sekvence nukleových kyselin kvasinky získané přímo z krve nebo bioptického materiálu (Sullivan and Coleman, 2002).

Kultivační metody

Kvasinky rodu *Candida* lze kultivovat na Sabouraudově půdě. Je to peptono-glukózový nebo peptono-maltózový agar, který má pH 5,5. Jeho selektivita se může zvýšit přidáním antibiotik, např. chloramfenikolu. Některé druhy, jako např. *C. albicans*

a *C. dubliniensis*, rostou i v přítomnosti cykloheximidu. Po naočkování se vzorky kultivují při teplotě 26 °C a 37 °C alespoň 3 – 5 dnů, než lze prokázat přítomnost či nepřítomnost kandid. Kandidemie se prokazuje aerobní hemokultivací.

Při kultivačním vyšetření se hodnotí barva kolonií vyrostlých na chromogenních agarrech např. CHROMagar, Albicans ID, ID Candida, což umožňuje do určité míry rozlišit druhy kandid. Důležitou roli v diagnostice kandidóz hrají metody studující morfologické znaky těchto kvasinkových patogenů. Významné pro průkaz invazivního procesu je histologické vyšetření vzorku tkáně s nálezem kvasinek a hyf. Kromě mikroskopického porovnávání velikosti a tvaru buněk se vyhodnocuje schopnost tvořit hyfy, popř. pseudohyfy a za určitých podmínek (např. na půdě se žlučí) tvořit 7 – 10 µm velké silnostěnné buňky (tzv. chlamydospory) umístěné na koncích i po stranách hyf. Tvorba chlamydospor je typická pro druhy *C. albicans* a *C. dubliniensis*. Tyto dva druhy se také vyznačují tvorbou zárodečných klíčků (tzv. germinace), která se zjišťuje buď naočkováním kmene do séra nebo sklíčkovou mikrokulturovou na půdě s Tweenem 80. Zárodečné klíčky se tvoří po tříhodinové inkubaci.

Druh izolovaných kandid se dá také určit pomocí testů založených na biochemických odlišnostech jednotlivých druhů kandid. Různé kandidy zkvašují různé cukry, např. *C. albicans* štěpí glukózu, maltózu, sacharózu a neštěpí laktózu. Tyto testy se nazývají zymogramy. Dále se pro identifikaci kandid využívá jejich různá schopnost využít cukry a dusíkaté látky. Tyto asimilační testy se nazývají auxanogramy. Provedení biochemických testů je pracné a časově náročné (Bednář et al., 1994).

Mykologické laboratoře dnes mají k dispozici řadu komerčních kitů (např. API ID 32C, Auxacolor, Candifast, Fungitest, ATB Fungus 2) značně usnadňujících identifikaci. I zde zůstává nevýhodou časový faktor – výsledky je možné odečíst nejdříve po 24 hodinách a testy lze použít až po primární izolaci kvasinky. Další nevýhodou kitů je jejich vysoká cena (Richardson a Carlson, 2002).

Nekultivační metody

Současné nekultivační metody používané k diagnostice invazivní kandidózy jsou založené na detekci protilátek proti kandidovým antigenům, detekci přímo těchto antigenů, detekci neantigenních komponent např. kandidových metabolitů D-arabinitolu

a mannosy, komponent buněčné stěny (1→3)-β-D-glukanu nebo nukleové kyseliny kandid. Nekultivační metody mohou být využity jak k diagnostice, tak jako markery kompletní eradikace invazivní kandidózy při monitorování efektivity antifungální terapie.

Nejstarší nekultivační metodou je detekce protilátek proti kandidovým antigenům. Má dva hlavní limity – specifita testu může být nízká, protože i u pacientů, kteří jsou pouze kolonizováni kandidami, může být titr protilátek vysoký. Dalším limitem je nízká citlivost testu, protože u imunosuprimovaných pacientů protilátková odpověď může být opožděná, redukováná či úplně chybět. Specifita testu může být zvýšena selekcí vhodných antigenů a citlivost zlepšit použitím enzymové imunisorbční analýzy známé jako ELISA.

Problémy předchozího přístupu obchází metoda detekce antigenů. Hlavním cirkulujícím antigenem u pacientů s invazivní kandidózou je mannan. Jeho přítomnost může být prokázána i u imunosuprimovaných pacientů s nízkou protilátkovou odpovědí. Kromě mannanu se detekuje přítomnost mannoproteinů, Cand-Tec antigenu, enolasy atd. Detekovat můžeme i neantigenní komponenty např. (1→3)-β-D-glukan. Jeho výskyt v plazmě není specifický pro kandidové infekce, je důkazem jakékoliv probíhající mykotické infekce.

Nedostatky jednotlivých metod můžeme kompenzovat kombinacemi testů. Přesnost diagnózy kandidémie vzrostla, když se začaly užívat kombinace testů založených na detekci (1→3)-β-D-glukanu a mannanu nebo kombinací detekce (1→3)-β-D-glukanu a enolasy. Bohužel ani jedna z nekultivačních metod neumožňuje identifikaci druhu kandidy (Pontón et al., 2002).

Metody molekulární biologie založené na PCR

Polymerázová řetězová reakce tzv. PCR je rychlá metoda pro *in vitro* enzymatickou amplifikaci specifického úseku DNA. Počet využití PCR je široký a stále roste. Zahrnuje přímé klonování z genomové DNA nebo cDNA, *in vitro* mutagenézi DNA, genetický fingerprinting forenzních vzorků, zjišťování přítomnosti infekčního agens, prenatální diagnostiku genetických vad atd. (Ausubel et al., 1994).

Během posledního desetiletí byly provedeny četné studie za účelem posouzení využití PCR v diagnostice systémových infekcí způsobených *C. albicans* i jinými druhy kandid. V mnoha klinických studiích se podařilo detekovat 1 až 5 buněk *C. albicans* v 1 ml krve (Sullivan and Coleman, 2002).

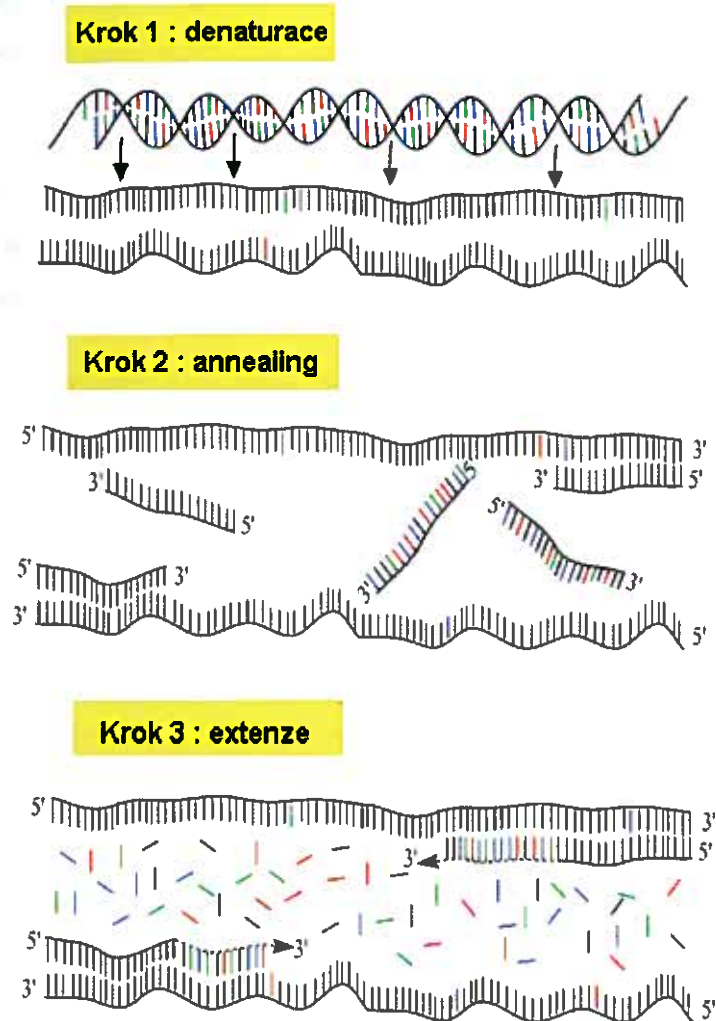
Princip PCR

DNA, která má být amplifikována, je denaturována zahřátím vzorku. Denaturace je proces, při kterém dochází k rozdělení dvouvláknové DNA (angl. *double-stranded DNA*, zkr. *dsDNA*) na dvě jednovláknové molekuly (angl. *single-stranded DNA*, zkr. *ssDNA*), čímž molekula ztrácí své přirozené uspořádání. Po snížení teploty na tzv. teplotu annealingu dochází k nasednutí dvou primerů, což jsou oligonukleotidy přidávané do reakce, na komplementární úseky templátové DNA. Po zvýšení teploty na tzv. teplotu extenze a v přítomnosti termostabilní DNA polymerázy a nadbytku dNTPs může začít syntéza komplementárního řetězce od 3'-konce primeru. Tyto změny teplot se cyklicky opakují. Teoretické schéma PCR je znázorněno na obrázku 1.

První cyklus je charakterizován tvorbou produktů neurčité délky, od druhého cyklu již kromě toho vznikají i produkty dlouhé přesně jako úsek templátové DNA vymezený primery. Produkty neurčité délky mohou vznikat pouze podle původní templátové DNA, která zůstává v reakci ve stále stejném počtu exemplářů, takže se produkty neurčité délky hromadí pouze aritmetickou řadou (+2+2+2...). Naproti tomu produkty délkově přesně vymezené vznikají podle templátu produktů s neurčitou délkou i produktů délkově přesně vymezených, takže se hromadí geometrickou řadou ($\times 2 \times 2 \times 2 \dots$). Každý jednotlivý produkt může sloužit jako templát pro syntézu DNA v následujících cyklech, proto se v každém cyklu množství produktu zdvojnásobuje. Během 20 až 30 cyklů dochází k mnohamiliónové amplifikaci vymezeného úseku DNA.

Primery jsou přidávány ve velkém nadbytku vzhledem k amplifikované DNA. Při správně nastavených podmínkách hybridizují k řetězcům DNA v místech, kde je sekvence amplifikované DNA komplementární k sekvenci primeru. Syntéza probíhá pomocí DNA polymerázy, která katalyzuje růst nového řetězce ve směru 5' \rightarrow 3'.

PCR je často používaná, protože je nejvíce citlivou metodou pro vzácně se vyskytující sekvence. PCR taky umožňuje kvantifikaci detekované DNA. Negativní stránkou vysoké citlivosti této metody je, že kontaminace velmi malými množstvími nežádoucí exogenní DNA může znehodnotit celý pokus. Proto byly vyvinuty speciální postupy, jak této kontaminaci zabránit (Ausubel et al., 1994).



Obr. 1: Schéma polymerázové řetězové reakce

Provedení PCR

První krok PCR spočívá ve smíchání templátové DNA, dvou vhodných oligonukleotidových primerů, Taq DNA polymerázy, deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTPs) a pufru. Taq DNA polymeráza má určitou aktivitu i při pokojové teplotě, což může způ-

sobit nasedání primerů na templátovou DNA i na místech nízké komplementarity, čímž se zvyšuje množství nespecifických produktů. K zabránění polymerizace před prvním cyklem s kontrolovanými teplotami se dají použít tři způsoby – metoda zvaná “hot start”, ochlazení reagensů na 0 °C a reverzibilní blokáda enzymové aktivity protilátkami.

“Hot start” znamená, že denaturace templátu a nasedání primerů je provedeno dřív, než je do reakce přidána polymeráza. Toto uspořádání v mnoha případech přináší dramatické zlepšení specifity a citlivosti. Nevýhodou je, že je nutné opakovaně otevřít reakční zkumavku, což je nepohodlné a zvyšuje to nebezpečí kontaminace.

Vychlazení všech komponent reakční směsi na 0 °C před smícháním je pohodlné a nejméně finančně náročné. Avšak nespecifické nasedání primerů se může objevit v době, kdy se reakční směs zahřívá z 0 °C na teplotu denaturace.

Reverzibilní inhibice Taq DNA polymerázy pomocí anti-Taq protilátek je nejvhodnější a velmi efektivní. Kompletní směs může být sestavena, převrstvena olejem a uchovávána při 4 °C až několik hodin bez ztráty citlivosti a specifity. PCR je zahájena okamžitě po denuraci protilátek, ke které dochází po 5 minutách při teplotě 94 °C.

Směs je podrobena mnoha cyklům (obvykle 30), v kterých je měněna teplota tak, aby umožnila postupně denuraci, nasedání a syntézu, což vede ke vzniku produktu specifické velikosti a sekvence. Každý krok v cyklu potřebuje určitý minimální čas, aby proběhl efektivně. Naopak příliš dlouhá doba je zbytečná a nešetrná pro polymerázu (Ausubel et al., 1994). Cyklické změny teplot reakční směsi lze řídit automatizovaně pomocí tzv. termocykleru. Zkumavky s reakční směsí jsou v termocykleru uloženy v kovovém bloku, jehož teplota je řízena podle programu nastaveného uživatelem. Reakční směs je podobně jako u jiných biochemických reakcí sestavena v mikrozukavce, odlišnost spočívá v tom, že mikrozukavka musí být tenkostěnná, aby umožňovala rychlé změny teplot vzorku. Převrstvením reakční směsi minerálním olejem se zabrání jejímu výparu při zahřívání.

Pro denuraci bývá postačují 60 sekund při 94 °C. Nejvhodnější teplota nasedání primerů závisí na jejich teplotě tání a podmínkách reakce a lze ji určit výpočtem na základě termodynamických vlastností sekvence primeru nebo experimentálně (empiricky). Je-li zvolená teplota nasedání nižší než teplota optimální,

dochází k snadnějšímu nasedání primerů, ale taky narůstá pravděpodobnost nasednutí mimo cílové komplementární oblasti a zvyšuje se pravděpodobnost vzniku resp. zvýšení množství nespecifických produktů. Teplota extenze 72 °C je blízká optimální teplotě pro aktivitu Taq DNA polymerázy (~75 °C) a zároveň není tak vysoká, aby způsobila uvolnění primerů z templátové DNA. Extenze začíná už ve fázi nasedání primerů, protože enzym je aktivní už při 55 °C i nižších teplotách. Délka extenze závisí hlavně na délce amplifikované sekvence (Ausubel et al., 1994). Protože Taq-polymeráza nefunguje bezchybně a může se někdy z templátového vlákna předčasně uvolnit, takže mohou vznikat neúplné produkty, provádí se na závěr PCR ještě tzv. konečná extenze, což je prodloužená inkubace při 72 °C, která umožní dokončit syntézu neúplných produktů.

Detekce produktu a druhová identifikace

PCR produkt je poté zobrazen na gelu, je hodnocena výtěžnost a specifita amplifikace. Ke třídění molekul DNA se používá nejčastěji agarózový gel, pro menší molekuly pak také polyakrylamidový gel. Gel je hmota tvořená prostorovou sítí vláken určitého typu polymeru, volný prostor mezi vlákny polymeru je vyplněn vodným roztokem, ve kterém se rozpouští nukleové kyseliny. Gel je umístěn do elektrického pole mezi dvě elektrody - kladně a záporně nabitou. Protože jsou nukleové kyseliny záporně nabité, pohybují se směrem ke kladně nabité elektrodě. Při průchodu gelem dochází mezi molekulami a sítí polymerů ke tření, které je větší u velkých molekul a menší u malých molekul, takže se molekuly během průchodu gelem třídí podle velikosti. Tento proces se nazývá elektroforéza v gelu.

Molekuly nukleových kyselin je po skončení elektroforézy možné nabarvit ponořením gelu do lázně s fluorescenčním barvivem ethidium bromidem. Po umístění gelu na plochý zdroj UV-záření (UV-transiluminátor) molekuly DNA v gelu září. Je také možné přidat ethidium bromid přímo do tekutého roztoku gelu ještě před jeho vylitím do elektroforetické vany. Aby bylo možné zjistit z gelu délku amplifikovaného produktu, používají se při elektroforéze tzv. markery molekulové hmotnosti, které se umísťují do některých jamek v gelu a podrobí se elektroforéze za stejných podmínek jako amplifikovaný produkt.

V případě, že jsou použity primery specifické pouze pro určitý druh patogena, je identifikován pouze na základě přítomnosti amplikonu očekávané velikosti. V případě, že jsou použity primery specifické pro daný rod nebo širší skupinu patogenů, lze druh identifikovat různými typy post-PCR analýzy. Nejjednodušší je identifikace podle délky produktu, ale rozdíly ve velikosti amplifikované oblasti mezi jednotlivými druhy jsou často nepatrné, takže je zapotřebí použití speciálních přístupů, např. kapilární elektroforézy v kombinaci s fluorescenčně značenými primery.

Další možností identifikace je hybridizace s druhově specifickou sondou, která je homologní k sekvenci uvnitř amplikonu jen určitého druhu. Tento postup je dosti pracný, ale může být automatizován ve formátu mikrotitrační destičky s pomocí techniky EIA (enzyme immunoassay). Alternativu představuje použití oligonukleotidů homologních k druhově specifickým sekvencím v následné tzv. uhnížděné PCR.

Další jednoduchou metodou umožňující druhovou identifikaci je enzymová restriční analýza a stanovení délky restričních fragmentů, které jsou specifické pro každý druh. Nejpřesnější určení druhu pak umožňuje přímé sekvenování amplikonu.

Tyto metody jsou velkým příslibem do budoucnosti, ale v současné době není většina klinických laboratoří vybavena pro jejich aplikaci (Sullivan and Coleman, 2002).

Parametry PCR a jejich optimalizace

Důležité parametry, které svou variabilitou mohou ovlivnit výstup PCR, zahrnují koncentraci hořčíku, použité teploty, především teplota nasedání primerů, a přidání aditiv, které zvyšují stabilitu a účinnost polymerázy a zlepšují úspěšnost nasedání primerů.

Ionty Mg^{2+} nesespecificky stabilizují interakci mezi primerem a templátovou DNA. Optimální koncentrace hořečnatých iontů se liší u různých primerů, je třeba ji určit empiricky v kombinaci s nejvhodnější teplotou nasedání primeru. Obvykle používané koncentrace se nachází v rozmezí 1,5-5,0 mM (Ausubel et al., 1994).

Pro každou PCR, která má za cíl amplifikovat konkrétní úsek templátové DNA, je potřeba navrhnout vhodný pár primerů. Optimální primerový pár by měl úspěšně

nasedat na vybraný úsek DNA a minimálně nasedat na jiné úseky DNA ve vzorku. Pro splnění tohoto požadavku jsou nejvhodnější primery dlouhé nejméně 18 nukleotidů. Nebylo prokázáno, že by primery delší než 30 nukleotidů zvyšovaly specifitu reakce (Ausubel et al., 1994). Oba primery musí mít shodnou, nebo téměř shodnou teplotu tání a nesmí tvořit tzv. dimery a vlásenky, proto je dobré použít vzájemně nekomplementární primery, zejména na jejich 3' konci. Dalším důležitým rysem vhodného primerového páru, který má být užíván k přímému vyšetřování klinických vzorků, je, že nereaguje s DNA hostitelského organismu.

Vzdálenost mezi primery je flexibilní, sahá až k 10 kb. Malá vzdálenost mezi primery snižuje možnost získání více informací nebo užití dalšího kola nested PCR. U mykopatogenů jsou v mnoha případech používány panfungální primery nebo primery specifické pro daný rod hub v kombinaci s druhově specifickými primery v nested PCR, což umožňuje druhovou identifikaci (Sullivan and Coleman, 2002).

I relativně degradovaná DNA může úspěšně sloužit jako templát pro získávání středně velikých PCR produktů. Dva hlavní předpoklady pro zdárný průběh amplifikační reakce je čistota a dostatečné množství templátové DNA. K detekci genu, který má jednu kopii v genomu, je obvykle postačující 100 ng genomické DNA.

Pro PCR se používají termostabilní DNA polymerázy, např. *Taq* DNA polymeráza, nazvaná podle bakterie *Thermus aquaticus*, ze které je izolována. Mezi výhody *Taq* DNA polymerázy patří termostabilita, schopnost snášet opakované chlazení a zahřívání a schopnost syntetizovat DNA při vysokých teplotách. Bohužel enzym není zcela odolný k poškození vysokou teplotou, jeho aktivita s opakovanou denaturací DNA částečně klesá. Zvýšení množství *Taq* DNA polymerázy nad 2,5 U na reakci, které by mohlo tento úbytek kompenzovat, může někdy zvýšit výtěžnost reakce, ale jen do určité hranice. Přídavek enzymu taky zvyšuje množství vznikajících nespecifických produktů. Další protiargumentem zvyšování množství polymerázy v reakční směsi je její vysoká cena (Ausubel et al., 1994). Dnes používané polymerázy jsou dále upraveny metodami genové manipulace tak, aby byly odolnější vůči teplotě a výkonnější.

Amplifikace DNA fragmentů pomocí polymerázové řetězové reakce často vyžaduje optimalizaci reakčních podmínek, které vedou k odstranění nežádoucích nespecifit a ke zvýšení množství PCR produktu. Optimalizace zahrnuje úpravy

koncentrace hořečnatých iontů, koncentrace polymerázy, teplotu nasedání oligonukleotidových primerů a další. V některých případech může být optimalizace rychle dosažena přidáním aditiv (např. DMSO, formamid). Zajímavé efekty poskytuje nedávno popsaný enhancer tetramethylammonium oxalát, který je dodáván pod obchodním označením PCR enhancer.

Získání templátové DNA

Kromě výběru primerů je třeba zvolit vhodnou extrakční metodu k získání nukleové kyseliny, kterou použijeme dále do amplifikační reakce jako templát. Teoreticky se dá k izolaci použít téměř jakákoliv tkáň pacienta trpícího systémovou kandidózou, ale většinou pracujeme se vzorky krve. K uvolnění nukleové kyseliny z buňky je třeba rozrušit buněčnou stěnu kvasinek buď enzymaticky (nejčastěji zymolýzou) nebo mechanicky (např. protřepáváním na vortexu se skleněnými kuličkami, drcením tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce apod.), případně i varem. Mechanické narušení nebo narušení varem je ovšem méně efektivní, proto je použitelné jen u extrakce DNA z velkého množství buněk získaných z kultury, nikoli u klinického vzorku. K rozpuštění biomembrán a denaturaci proteinů se užívá detergent (obvykle Triton X-100 a laurylsíran sodný), případně se zařazuje působení proteinázy K, která proteiny přímo degraduje, včetně histonů vázaných na DNA (Sullivan and Coleman, 2002).

K přečištění izolované DNA používá buď tradiční fenol-chloroformová metoda, při které jsou nukleové kyseliny ponechány rozpuštěné ve vodném prostředí (pufru) a odstraňují se ostatní složky lyzátu, především proteiny. K lyzátu je přidána směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu, dojde k vysrážení bílkovin. Další často používaný přístup je založen na zjištění, že DNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí adhezuje na silikátový povrch. Ostatní sloučeniny zůstávají v roztoku a lze je pak jednoduše odstranit – částice silikátu sedimentujeme odstředěním, odsajeme roztok nad částicemi a propláchneme novou dávkou pufru s chaotropními solemi. Čistou DNA naadherovanou na částicích lze snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru, který neobsahuje chaotropní soli.

Výhodou metody založené na adsorpci na silikát je rychlost a pohodlnost, proto jsou na ní založeny komerční soupravy (kity) pro rutinní extrakce DNA. V kitech se

obvykle používají nástavce do mikrozkmavek, obsahující jemný filtr, který zadrží silikátové částice. Zpracování pak probíhá tak, že jsou roztoky promývány přes kolonku (filtr se zachycenými částicemi). Namísto tradičního silikátu kity často využívají speciální pryskyřice a mají různě upravené složení pufrů tak, že např. preferují při adsorpci molekuly DNA určitého velikostního rozpětí.

Stanovení koncentrace a čistoty vyizolované nukleové kyseliny

Pro stanovení *in vitro* citlivosti metod je nezbytné použít ředící řadu ověřeného množství templátové DNA. Nejčastější a nejjednodušší způsob měření je založen na tom, že aromatické struktury bází specificky absorbují UV-záření určitých vlnových délek. Intenzitu absorpce látek, rozpuštěných v roztoku, lze měřit spektrofotometrem. Pokud jsou v roztoku pouze nukleové kyseliny, pak míra specifické absorpce odpovídá koncentraci nukleových kyselin v roztoku. Roztoky jsou však často kontaminovány bílkoviny, které také specificky absorbují UV-záření. Protože intenzita absorpce UV-záření nukleovými kyselinami a bílkoviny se liší při různých vlnových délkách, čistotu vzorku lze posoudit z poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm. Pro výpočet koncentrace nukleové kyseliny se na základě známé absorbance A_{260} používají speciální vzorce. Například koncentrace dsDNA o neznámé molekulové hmotnosti se dá stanovit dle formule:

$$c = A_{260} / 0,02 \quad [\mu\text{g/ml}]$$

Čistota vzorku je nejjednodušeji dána poměrem $A_{260/280}$. Protože bílkoviny interferují s mnoha reakcemi, měl by být tento poměr alespoň 1,8, nejlépe 2,0.

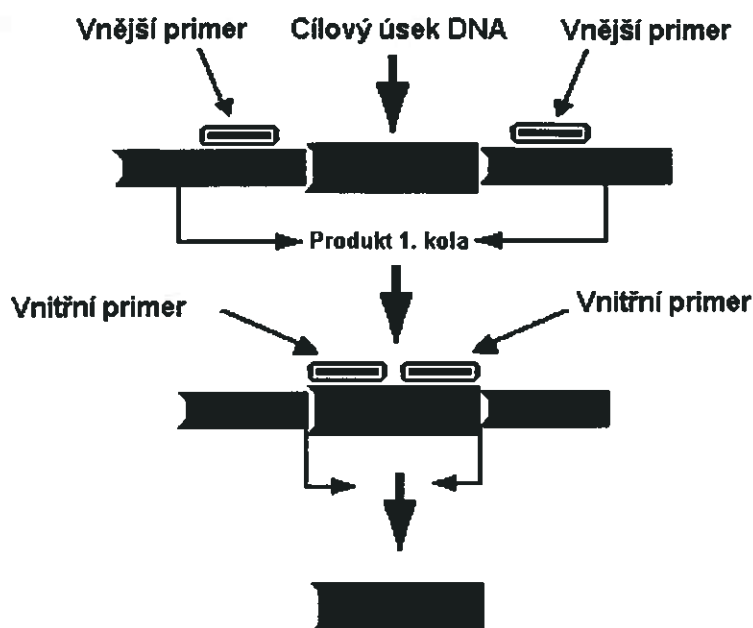
Druhý nejčastější způsob měření nukleových kyselin je založen na jejich obarvení fluorescenčním barvivem. Nejčastěji jsou používány Hoechst 33258 nebo ethidium bromid. Ve fluorimetru lze pak změřit specifickou fluorescenci barviva, intenzita fluorescence odpovídá množství navázaného fluorescenčního barviva. Toto množství pak odpovídá množství molekul, na které se barvivo váže. Fluorimetrie umožňuje změřit správně koncentraci nukleových kyselin i ve směsi s proteiny a je výrazně citlivější než spektrofotometrické měření, na druhé straně nás na přítomnost kontaminujících proteinů neupozorní (Sullivan and Coleman, 2002).

Měření množství DNA je u technik detekce patogena v klinickém vzorku potřebné především k přípravě standartů, používaných ke kontrole citlivosti detekční techniky. Samotná DNA patogena, extrahovaná z klinického vzorku, je přítomna ve velmi malém množství, navíc ve směsi s lidskou DNA a není účelné určovat její koncentraci před provedením PCR.

Nested PCR

Polymerázová řetězová reakce je výkonná metoda k namnožení specifické sekvence DNA. Je možné navrhnout primery tak, aby amplifikovaly jen jediný úsek z celého genomu. Z jediné molekuly templátu je možné velmi rychle vyprodukovat více než jednu miliardu kopií PCR produktu. Přesto nejsou možnosti množení templátové DNA neomezené, proto běžná PCR dosahuje jen určité citlivosti. Dalším problémem tradiční PCR může být, že její specifita je plně závislá na specifitě primerů. Pokud použité primery nasedají i na jiná místa v genomu, pak je amplifikováno více segmentů DNA a získáme několik různých produktů. Existuje i možnost, že vznikne jiný amplikon velmi podobné délky, takže ho pak nelze běžnou elektroforézou v gelu odlišit a hrozí riziko nesprávné interpretace výsledku. Ke snížení tohoto rizika a ke zvýšení citlivosti PCR je často používána tzv. uhnížděna neboli nested PCR.

Nested PCR se skládá ze dvou samostatných amplifikačních reakcí, ve kterých jsou použity odlišné primerové páry. Do první PCR se přidává první pár primerů (tzv. vnější primery), které amplifikují určitou sekvenci tak, jak je obvyklé při běžné PCR. Do druhé PCR reakce je použit druhý primerový pár (tzv. vnitřní primery), které využívají produkty první reakce jako templát. Vážou se uvnitř produktu z prvního kola, protože cílová sekvence vnitřního primerového páru leží uvnitř cílové sekvence vnějšího primerového páru, a vzniká tak produkt druhé reakce, který je kratší než ten první. Schéma nested PCR znázorňuje obrázek 2.



Specifická amplifikace cílového úseku DNA

Obr. 2: Schéma nested PCR

Výhodou tohoto uspořádání je, že pokud byl v prvním kole amplifikován kromě správného úseku i špatný, je velmi nízká pravděpodobnost, že se na něj budou vázat primery druhého kola a amplifikovat ho, čímž se zvýší specifita PCR. Toto uspořádání také zvyšuje citlivost reakce díky opakované amplifikaci produktu z první reakce. Tohoto zlepšení bychom nedosáhli prostým zvýšením počtu cyklů díky omezené životnosti DNA polymerázy, ani kdybychom v obou kolech nested PCR použili stejné primery, protože bychom získali nespecifické produkty.

Využití nested PCR v diagnostice kandidózy

Od devadesátých let byla na základě znalosti genomové sekvence kandid publikována řada oblastí kandidové DNA, které jsou využitelné k detekci těchto patogenů metodou PCR. Pro diagnózu systémové kandidózy se nejvíce osvědčily následující oblasti:

1. *Candida* – specifické sekvence: oblast genů kódujících aspartylproteinázu (Flahaut et al., 1998), chitinsyntázu (Jordan, 1994), aktin (Kan, 1993) nebo HSP 90 (*angl.* heat shock protein 90) (Crampin and Matthews, 1993).

2. Panfungálně se vyskytující sekvence:

- Oblast genů kódujících cytochrom P-450 dependentní lanosterol-14 α -de-methylázu (L1A1). Tento gen je rozšířen u všech hub, jeho produkt katalyzuje konverzi lanosterolu na ergosterol, který je nezbytnou součástí plazmatické membrány hub (Buchman et al., 1990).
- Oblast genů kódujících ribozomální RNA (rRNA), konkrétně 18S, 5.8S a 28S rRNA podjednotky. Často se využívá i úseků vmezeřených mezi tyto sekvence, tzv. ITS oblastí (*angl.* internal transcribed spacer), v kterých lze nalézt sekvence jedinečné pro jednotlivé druhy kandid – ITS1 oblast mezi 18S a 5.8S rRNA geny (Hsein, 2001) a ITS2 oblast mezi 5.8S a 28S rRNA geny (Chen et al., 2000; Reiss et al., 2000).
- Oblast genů kódujících DNA topoizomerázu II (tento gen je sice přítomen u všech eukaryotních organismů, ale je tvořen jak vysoce homologními tak i druhově specifickými úseky) (Kanbe et al., 2002).

K detekci kandid se nejčastěji využívá amplifikace oblasti rRNA genů. Tento úsek se totiž narodil od výše uvedených vyskytuje v haploidním genomu kandid v 50 až 100 kopiích, což významně zvyšuje citlivost PCR metody. Navíc byla tato oblast velmi rozsáhle prostudována fylogenetickými analýzami a ukázalo se, že vedle vysoce konzervovaných oblastí obsahuje i variabilní úseky, takže je přístupná pro navržení panfungálních i druhově specifických primerů (Fell et al., 1992).

Rodově specifická oblast kódující enzym aspartylproteinázu patří také mezi geny, které mají početnější zastoupení v genomu kandid (uvádí se přinejmenším devět kopií), čímž taktéž zvyšuje citlivost DNA detekce (Flahaut et al., 1998). Uhnížděná PCR je z hlediska diagnostiky systémové kandidózy metoda rychlá, jednoduchá, spolehlivá a pro většinu moderních mikrobiologických laboratoří dostupná. Díky své vysoké citlivosti a specifičnosti umožňuje detekci a identifikaci rozhodujících patogenních kandid i ve velmi ranném stádiu infekce. Bohužel nepokrývá celé spektrum patogenních druhů kandid a díky manipulaci s produkty prvního kola při sestavování reakční směsi pro druhé kolo je velice náchylná ke kontaminaci.

Kvantitativní PCR v reálném čase

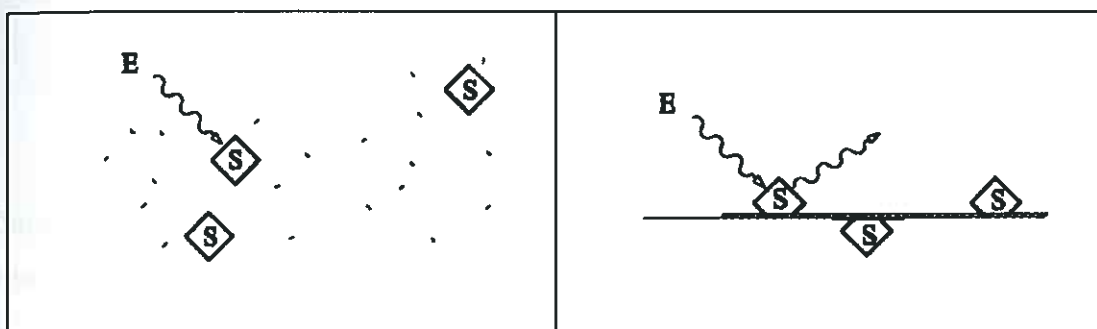
Tradiční PCR je označována také jako tzv. end-point PCR, protože její výsledek je hodnocen až po skončení reakce, v tzv. koncovém bodě křivky množení produktu. Tato křivka končí vždy esovitým plató, bez ohledu na vstupní množství amplifikované templátové DNA. Důvodem je inhibice dalšího množení produktu, způsobená především interferencí hromadícího se produktu s nasedáním primeru. U end-point PCR proto není možné určit množství vstupní templátové DNA.

Tento problém bylo možné v rutinním použití vyřešit až s vývojem kombinace termocyklieru s fluorimetrem (Wittwer et al, 1997), který umožňuje sledovat fluorescenci reakční směsi v průběhu PCR, tj. v reálném čase. Postupně bylo vyvinuto několik technik, jak sledovat pomocí měření fluorescence průběh množení produktu PCR (viz dále). Korelace stoupající fluorescence s množením produktu umožňuje sledovat křivku množení produktu, jejíž průběh je v exponenciální fázi – tj. předtím, než dosáhne koncového bodu (= plató) - závislý na množství vstupní templátové DNA.

Srovnání výsledků získaných s neznámým vzorkem s výsledky získanými se vzorky obsahujícími standardní známá množství templátové DNA umožňuje v tomto případě také přesné určení množství templátové DNA v neznámém vzorku. V lékařské mikrobiologii včetně mykologie je tato informace cenná především v případech, kdy množství detekovaného patogena, resp. jeho DNA, koreluje se závažností infekčního procesu, příp. s jeho odezvou na léčbu.

Další významnou výhodou PCR v reálném čase je – v případě že je prováděna v kapilárách nebo vhodných mikrozkuřavkách – zkrácení zejména časů denaturace DNA, které umožňuje šetřit aktivitu Taq-polymerázy, a také zkrácení času přechodů mezi jednotlivými teplotami, které snižuje interferenci renaturace produktu s nasedáním primerů. Obojí umožňuje provádět kvantitativní PCR až v 50 cyklech se zvýšenou výtěžností a tedy i citlivostí ve srovnání s klasickou jednokolovou PCR, u které nelze množství produktu zvýšit při překročení cca 40 cyklů. Pokud je kvantifikace založena na hybridizaci vznikajícího produktu se sondou, je u PCR v reálném čase také zvýšena specifita přidáním dalšího hybridizačního kroku, který navíc k nasedání páru primerů dále potvrzuje identitu amplifikované sekvence.

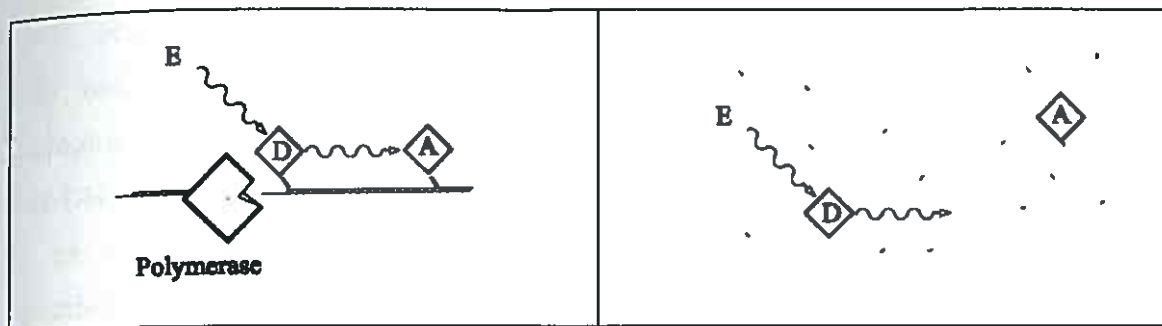
Nejjednodušším způsobem monitorování průběhu amplifikace je užití interkalační barviva např. Sybr-Green I, LC green. Nevázané barvivo vykazuje v roztoku jen malou fluorescenci, po jeho navázání k dvouvláknové DNA se fluorescence zesílí. V průběhu amplifikační reakce se barvivo váže k postupně přibývajícím produktům amplifikace a tím fluorescence vzrůstá. Speciální termocyklery, určené pro kvantitativní PCR v reálném čase, jsou schopny v průběhu PCR ozařovat vzorek excitačním zářením, které vybudí fluorescenci vázaného barviva. Tuto fluorescenci přístroj po každém cyklu změří a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje průběžně - v reálném čase - hodnotu fluorescence, které odpovídá množství vzniklého produktu. Podstata tohoto děje je znázorněna na obrázku 3.



Obr. 3: Real-time PCR, použití interkalačního barviva. Sybr-Green (S) se neváže k ssDNA a intenzita (E) fluorescence je nízká. Váže se k dsDNA; intenzita fluorescence vzrůstá.

Interkalační barvivo může být jednoduše přidáno do reakční směsi ve stejnou dobu jako ostatní komponenty (voda, pufr, $MgCl_2$, dNTPs, Taq polymeráza, primery a templátová DNA). Použití těchto barviv nevyžaduje syntézu specifických sond, čímž se snižuje nákladnost real-time PCR. Nevýhodou je, že interkalační barviva se nespecificky vážou na jakoukoliv dvouvláknovou DNA včetně nespecifických produktů a primerových dimerů.

Dalším přístupem je použití sond označených fluorescenčním barvivem. Tato sonda musí být navržena tak, aby hybridizovala s templátovou DNA za stejných podmínek jako primery, a to tak, že nasedne na templátovou DNA v místě mezi místy nasednutí obou protisměrně orientovaných primerů. V současné době jsou k dispozici různé typy sond - tzv. FRET sondy, TaqMan sondy (princip viz obr. 4), Molecular Beacons sondy.



Obr. 4: Real-time PCR, příklad použití fluorescenčně značené sondy. Energie (E) emitovaná donorovým (D) fluoroforem je absorbována/zhášena akceptorovým (A) fluoroforem. Exonukleázová aktivita polymerázy oddělí donorový fluorofor od akceptorového fluoroforu a tím vzroste fluorescence.

Ostatní metody molekulární biologie

Jednou z těchto metod je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Zahrnuje užití fluorescenčně značených DNA sond k detekci kvasinkových buněk *in situ* zejména ve vzorcích tělních tekutin, ale i v histologických vzorcích. Fluorescenční mikroskopie následně odhalí přítomnost těchto buněk ve vzorcích a identifikuje každý druh specificky, podmínkou je testování vzorku zvlášť s každou sondou. Experimenty prokázaly, že tato metoda dokáže zachytit tři buňky v 0,5 ml krve, což je přibližně stejná citlivost jako u PCR, v rámci stejného času jako je potřeba pro provedení PCR (Sullivan and Coleman, 2002). Byla vyvinuta metoda FISH pro odlišení *C. albicans* od non-*albicans* druhů a její použitelnost v praxi byla ověřena multicentrickou studií (Wilson et al, 2005). Detekce kvasinek pomocí FISH může být výhodná zejména při vyšetřování pozitivních hemokultivačních nádobek, ve kterých došlo k pomnožení mikrobiálního agens.

Další publikovanou alternativou k PCR v detekci houbových patogenů je tzv. NASBA (*angl.* Nucleic Acid Sequence Based Amplification). NASBA je specifická a velmi citlivá technika k amplifikaci RNA. Konzervativní oblasti 18S r RNA genu medicínsky významných hub jsou amplifikovány směsí tří enzymů – reverzní transkriptázou, RNásou H a T7 RNA polymerázou. Značené oligonukleotidové proby pak hybridizují k vnitřním sekvencím specifickým pro daný druh patogena. Amplifikace a detekce může být provedena během několika hodin. Byl vyvinut systém detekce šesti různých druhů kandid založený na principu NASBA (Loeffler et al., 2003).

Hlavní výhodou této metody oproti PCR je, že není potřeba termocykler, protože celá reakce probíhá při stejné teplotě, a také vyšší citlivost, protože využívá k amplifikaci RNA, která je v buňce zastoupená v mnohonásobně větším počtu kopií než DNA (udává se *in vitro* detekční limit až $0,01 \text{ cfu.ml}^{-1}$). Další výhodou je, že RNA je na rozdíl od DNA mimo buňky rychle degradována, takže NASBA detekuje specificky živé buňky kandid ve vzorku. Nevýhodou, která brání rozšíření této metody, jsou stále vysoké náklady na nákup směsi tří enzymů (Widjoatmodjo, 1999).

Cíl práce

Předmětem práce byla optimalizace systému detekce a identifikace DNA vybraných druhů lékařsky významných kvasinek rodu *Candida*, který byl publikován Kanbe et al., 2002. Tento systém využívá uhnížděné PCR s použitím univerzálních primerů pro *Candida* sp. v 1. kole, po kterém následuje 2. kolo s druhově specifickými primery, které jsou navíc sdruženy po skupinách do směsí kompatibilních pro multiplex PCR. Předchozí výsledky prokázaly v laboratoři školitele vysokou specifitu systému, ale neuspokojivou citlivost. Cílem práce bylo zvýšit tuto citlivost při zachování uspokojivé specifity zajišťující rozlišení 5 lékařsky nejvýznamnějších druhů patogenních kvasinek (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*).

Materiál a metodika

Mikroorganismy

Kvasinky rodu *Candida* byly získány ze sbírky klinických izolátů kvasinkovitých mikroorganismů Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého (LF UP) v Olomouci. Jako reprezentativní kmeny rodu *Candida albicans* byly vybrány referenční kmen RK1CAAL a dále kmen *Candida albicans* (sbírkové číslo izolátu HE 0054). Pro testování specifity PCR byly používány další kmeny klinicky významných druhů kandid: *C. tropicalis* (HE 0043), *C. glabrata* (HE 0024), *C. parapsilosis* (HE 0007) a *C. krusei* (HE 0003). Jejich druhová identifikace probíhala na Ústavu mikrobiologie klasickými rutinními postupy.

Chemikálie

10x Taq pufr Complete (Top Bio, ČR)
agaróza (Life Technologies, UK)
bromfenolová modř (Sigma, USA)
ddH₂O (MilliQ Water)
Dithiothreitol (Sigma, USA)
DNA Lego kit (Top Bio, ČR)
DNA marker 150 – 970 (Top Bio, ČR)
DNA marker 200 – 1500 (Top Bio, ČR)
Lambda DNA/Hind III Marker (Fermentas, Kanada)
dNTPs (Promega, USA)
EDTA (Sigma, USA)
ethanol (Amresco, USA)
ethidium bromid (Amresco, USA)
fenol (Lachema, ČR)
glukóza (Lachema, ČR)
chlorid hořečnatý (Lachema, ČR)
chlorid sodný (Amresco, USA)
chloroform (Lachema, ČR)
isoamylalkohol (Amresco, USA)

kvasničný extrakt (Serva, Německo)
 laurylsíran sodný (Amresco, USA)
 LC Green (Biochem, USA)
 PCR enhancer (Top Bio, ČR)
 PCR H₂O (Top Bio, ČR)
 PCR olej (Top Bio, ČR)
 pepton (Oxoid, UK)
 primery (Genery Biotech, ČR; Metabion, Německo)
 sacharóza (Lachema, ČR)
 Sorbitol (Sigma, USA)
 Taq DNA polymeráza Unis (5 U.μl⁻¹) (Top Bio, ČR)
 Tris (Sigma, USA)
 TrisHCl (Ambion, USA)
 Triton X-100 (Amresco, USA)
 YeaStar Genomic DNA Kit (ZymoResearch, USA)
 Zymolyasa (Sigma, USA)

Pomůcky a přístroje

kádinky, odměrné válce, Erlenmayerovy baňky, skleněné pipety,
 automatické pipety FinnpiPETTE, umělohmotné špičky na pipety (10 - 1000 μl),
 tenkostěnné zkumavky pro PCR (Axygen Scientific, USA),
 centrifugační zkumavky (50 ml), zkumavky typu Eppendorf (1,5 ml),
 skleněné kuličky o průměru 0,4 mm (Ornela, Desenské sklárny, ČR),
 lékařské gumové rukavice.

Původ a názvy použitých přístrojů jsou uvedeny přímo v textu.

Získávání templátové DNA

Kultivace kvasinek v tekutém médiu

- (1) Do dvou Erlenmayerových baněk bylo napipetováno po 20 ml YPG (1 % kvasničný extrakt, 1 % pepton a 1 % glukóza) sterilní pipetou. Místo YPG lze použít i YPD (liši se typem cukru, YPD obsahuje místo glukózy dextrózu). Do jedné baňky bylo

přeneseno inokulum ze šikmého agaru. Druhá baňka sloužila jako negativní kontrola.

- (2) Obě baňky jsou ponechány přes noc ve vodní lázni 30 °C teplé kombinované s třepačkou (50 otáček za minutu; Julabo SW 22, Seelbach, SR).
- (3) Druhý den jsem připravila další Erlenmeyerovu baňku s 20 ml YPD (či YPG), do ní přemístila takový objem narostlé přesnoční kultury, aby byla optická denzita při ozáření světlem o vlnové délce 660 nm přibližně 0,4. Jako blank bylo použito čisté tekuté médium. Optická denzita byla měřena na přístroji Spekol 221 (Weiss Jena, SRN).
- (4) Erlenmeyerova baňka s přeočkovanou kulturou se dala inkubovat do vodní lázně 30 °C teplé, pravidelně byla kontrolována optická denzita. Ve chvíli, kdy optická denzita dosáhla hodnoty 1,2; inkubace se ukončila. Kvasinky se nacházejí v Lag fázi.

Izolace DNA fenol-chloroformovou metodou

- (1) 15 ml tekuté kultury kvasinek bylo stočeno ve falkonce o objemu 50 ml 10 minut při 3 000 otáčkách a laboratorní teplotě (centrifuga Beckman GS – 6KR, Beckman, USA).
- (2) Sediment byl resuspendován v 0,5 ml ddH₂O a přenesen do eppi o objemu 1,5 ml, stočen 10 minut při 1 500 otáčkách (centrifuga Hettich EBA 12R, Hettich, Německo), supernatant byl odebrán.
- (3) Pelet byl resuspendován v 200 µl lyzačního pufru, bylo přidáno 0,3 g skleněných kuliček Ballotini, 200 µl fenol-chloroform-isoamylalkoholu (25:24:1) a 3 minuty intenzivně vortexováno pomocí Vortex-Genie 2 (Scientific Industrie, USA).
- (4) Přidala jsem 200 µl TE pufru (100 µl 1M TrisCl o pH 8,0, 880 µl ddH₂O a 20 µl 0,5 M EDTA o pH 8,0), krátce zvortexovala a stočila 5 minut při 13 000 otáčkách. Vodní fáze byla přenesena do nové eppi o objemu 1,5 ml.

- (5) Přidala jsem 200 μl chloroform-isoamylalkoholu (24:1), zvortexovala a stočila 5 minut při 13 000 otáčkách. Vodní fáze byla přenesena do nové eppi o objemu 1,5 ml.
- (6) K vodné fázi byl přidán 1 ml 100 % etanolu vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, promíchán opatrným převrácením a kýváním. DNA jsem nechala srážet 60 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (doporučená doba je 30 min až několik hodin).
- (7) Obsah eppi jsem stočila 15 min při 18 000 otáčkách a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, odebrala supernatant. Pelet byl dvakrát propláchnutý 1 ml 70 % etanolu, stočen 10 minut při 18 000 otáčkách při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant jsem odebrala a pelet nechala krátce oschnout.
- (8) K peletu bylo přidáno 200 μl ddH₂O a půl hodiny necháno rozpouštět.
- (9) K roztoku DNA jsem přidala 1,5 μl RNasy a směs dala inkubovat na 60 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v termobloku (TB1, Schoeller Pharma Praha, ČR).
- (10) Směs byla stočena 5 minut při 13 000 otáčkách a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odebrala jsem supernatant.

Purifikace DNA pomocí DNA Lego kitu

- (1) Supernatant obsahující DNA byl smíchán s dvojnásobným objemem vazebního pufru a nechal se inkubovat 1 minutu.
- (2) Na čistou eppi (1,5 ml) byla nasazena kolonka, do kolonky vpraveno pomocí pipety 100 μl resuspendovaných DNA bind partikulí. Sterilní stříkačkou o objemu 5 ml se z kolonky vytlačila přebytečná kapalina.
- (3) Roztok obsahující DNA byl nanesen na kolonku pomocí stříkačky a mírným tlakem protlačen přes kolonku.
- (4) Kolonka byla dvakrát promyta 1 ml promývacího pufru. Eppi s kolonkou stočena 2 minuty při 13 000 otáčkách.
- (5) Kolonka byla přenesena do nové eppi (1,5 ml) a přidalo se 50 μl elučního pufru předeřhátého na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 2 minutách se eppi s kolonkou stočila 1 minutu při 13 000 otáčkách, čímž došlo k vymytí DNA z kolonky.

- (6) Při požadavku na kvantitativní vymytí DNA z kolonky lze promývání elučním pufrem a centrifugaci zopakovat ještě jednou stejně jako v bodě (5).
- (7) Izolovaná DNA byla uchovávána v mrazícím zařízení při teplotě $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Izolace DNA pomocí YeaStar Genomic DNA Kit

YeaStar Genomic DNA kit umožňuje rychlou izolaci DNA z různých druhů kvasinek.

- (1) Stočila jsem 1,5 ml tekuté kultury kvasinek připravené podle odstavce Kultivace kvasinek v tekuté médiu při 6 000 otáčkách 5 minut. Odstranila jsem supernatant.
- (2) Bylo přidáno se 120 μl YD Digestion Buffer a 5 μl R-Zymolyasy. Pelet byl resuspendován vortexováním a směs jsem dala inkubovat při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 40 až 60 minut. V případě neuspokojivých výsledků izolace může být doba inkubace prodloužena až na 16 hodin.
- (3) Přidala jsem 120 μl YD Lysis Buffer a směs promíchala vortexováním.
- (4) Přidala jsem 250 μl chloroformu, směs 1 minutu promíchávala.
- (5) Směs se zcentrifugovala 2 minuty při 10 000 otáčkách a supernatant se přenesl do Zymo-Spin III kolonky nasazené na čisté eppi (1,5 ml).
- (6) Eppi s kolonkou se zcentrifugovala 1 minutu při 10 000 otáčkách, přidalo se 300 μl DNA Wash Buffer a opět se při stejných podmínkách zcentrifugovalo. Promytí se ještě jednou zopakovalo.
- (7) Kolonka byla přenesena do nové eppi (1,5 ml) a na kolonku se nanoslo 60 μl ddH₂O nebo TE pufre. Po 1 minutě se eppi s kolonkou zcentrifugovala při 10 000 otáčkách 1 minutu.

Určení koncentrace DNA

Vzorky izolované DNA byly podrobeny spektrofotometrickému stanovení koncentrace DNA na základě měření absorpance při 260 nm. Určením poměru absorpance vzorku při 260 nm a 280 nm byla současně určena míra kontaminace

bílkovinami. Pro účely detekce kvasinkové DNA byly vybírány pouze vzorky, které měly tento poměr vyšší než 1,8 (spektrofotometr Jenway 6405 UV-Visible, GB).

Toothpick PCR

K usnadnění současné PCR analýzy mnoha klinických izolátů byla optimalizována metoda pro amplifikaci DNA přímo z lyzátů samostatných kolonií (Steffan et al., 1997).

- (1) Analyzované mikroorganismy byly naočkovány na Sabouraudovu půdu v Petriho miskách a kultivovány při 30 °C po dobu 24 až 48 hodin.
- (2) Pro každou reakci byla odebrána přibližně 1/10 samostatné kolonie (asi 10^6 buněk) parátkem nebo špičkou mikropipety a resuspendována v 5 μ l směsi skládající se z 1 M sorbitolu, 5 mM $MgCl_2$ a 2 mM dithiothreitolu. Ke směsi bylo přidáno 12 U zymolyasy. Zymolyasa byla připravena jako zásobní roztok o koncentraci 12 U/ μ l rozpuštěním v 1 M sorbitolu a byla skladována při -20 °C.
- (3) Směs byla inkubována 15 minut při 37 °C v termobloku (TB1, Schoeller Pharma Praha, ČR), pak byla zředěna na 300 μ l přidáním TE pufru. 0,3 μ l suspenze bylo přidáno do 1.kola PCR.

Příprava PCR směsi

Uhnížděná PCR je metoda velice citlivá na kontaminaci, proto byly všechny kroky prováděny v aseptickém prostředí laminárního boxu (EM Box 180, Ekom, ČR). Používány byly automatické mikropipety určené pro přípravu PCR směsi a jednorázové špičky opatřené filtrem zachycujícím aerosol vznikající při nasávání tekutiny do špičky. Věrohodnost dosažených výsledků byla zajištěna provedením negativní kontroly.

Příprava ředící řady templátové DNA

Zásobní roztok izolované DNA byly naředěn pomocí ddH₂O na výchozí koncentraci 0,5 ng. μ l⁻¹ dsDNA. Z této koncentrace byla připravena ředící řada DNA (viz tab. 1). Zhotovení ředící řady usnadnilo vnesení příslušného množství DNA do reakce při přípravě PCR směsi.

Tab. 1: Ředící řada templátové DNA.

Pořad.číslo roztoku DNA	Požadovaná koncentrace roztoku DNA	Objem roztoku DNA	Objem přidávané ddH ₂ O
I	0,5 ng.μl ⁻¹	Výpočet pro konkrétní koncentraci zásobního roztoku DNA	
II	50 pg.μl ⁻¹	10 μl roztoku DNA č. I	90 μl
III	5 pg.μl ⁻¹	10 μl roztoku DNA č. II	90 μl
IV	1 pg.μl ⁻¹	20 roztoku DNA č. μl III	80 μl
V	200 fg.μl ⁻¹	20 μl roztoku DNA č. IV	80 μl
VI	20 fg.μl ⁻¹	10 μl roztoku DNA č. V	90 μl
VII	2 fg.μl ⁻¹	10 μl roztoku DNA č. VI	90 μl
VIII	0,2 fg.μl ⁻¹	10 μl roztoku DNA č. VII	90 μl

Primery

Při amplifikaci kandidové DNA jsem využívala pár vnějších nespecifických primerů, které se přidávají do prvního kola PCR a jejichž činností vzniká nespecifický produkt, a dále pár vnitřních specifických primerů navržených na základě nukleotidové sekvence genu pro DNA topoizomerázu II, které umožňují druhovou identifikaci kvasinek rodu *Candida albicans*. Dále jsem testovala vliv fosforylace specifických primerů na 5' konci na citlivost amplifikační reakce. Charakteristiky primerů popisuje tabulka 2.

Tab. 2: Sekvence vnějších nespecifických a vnitřních specifických primerových párů pro druh *Candida albicans* (Kanbe et al, 2002)

Typ primeru	Označení primerů	Sekvence primerů (5' → 3')	Velikost amplifikovaného fragmentu (bp)
Vnější primery	CDF28 CDR148	GGTGGWMGDAAYGGDTWYGGYC CCRTCNTGATCYTGATCBGYCAT	
Vnitřní primery <i>C. albicans</i>	CABF59 CADBR125	TTGAACATCTCCAGTTTCAAAGGT AGCTAAATTCATAGCAGAAAGC	665

Sestavení Mastermixu

Aby byly následky pipetovacích chyb plynoucí z pipetování velmi malých objemů minimální, byl připraven vždy tzv. master mix (Mx), který kromě templátové DNA obsahoval všechny komponenty reakční směsi v množství dostačujícím pro všechny reakce daného kola. Složení master mixu pro obě kola klasické nested PCR prováděné na Robocykleru popisuje tabulka 3.

Tab. 3: Složení master mixu (Mx) pro jednu reakci, klasická nested PCR, obě kola, Robocycler Gradient 96.

Komponenty Mx	I. kolo	II. kolo
PCR H ₂ O	41,28 µl	42,28 µl
10x Taq pufr Complete ^{*)} (15 mM MgCl ₂)	5,00 µl	5,00 µl
dNTPs (25 mM)	0,32 µl	0,32 µl
Primer 1 (100 µM)	0,50 µl	0,50 µl
Primer 2 (100 µM)	0,50 µl	0,50 µl
Taq DNA polymeráza Unis (5 U.µl ⁻¹)	0,40 µl	0,40 µl
Celk. objem Mx pro jednu reakci	48,00 µl	49,00 µl

^{*)}10x Taq pufr Complete: 100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂.

Pro provedení nested PCR v jedné zkumavce bylo třeba sestavit Mx pro 1. kolo o objemu 18 µl pro jednu reakci. Před druhým kolem se přidával Mx II o objemu 10 µl přímo do reakční směsi z 1. kola. Složení master mixu pro obě kola nested PCR v jedné zkumavce prováděné na Robocykleru popisuje tabulka 4.

Tab. 4: Složení master mixu (Mx) pro jednu reakci, nested PCR v jedné zkumavce, obě kola, Robocycler Gradient 96.

Komponenty Mx	I. kolo	II. kolo
PCR H ₂ O	15,07 µl	7,81 µl
10x Taq pufr Complete (15 mM MgCl ₂)	2,00 µl	1,00 µl
dNTPs (25 mM)	0,13 µl	0,19 µl
Primer 1 (100 µM)	0,20 µl	0,30 µl
Primer 2 (100 µM)	0,20 µl	0,30 µl
Taq DNA polymeráza Unis (5 U.µl ⁻¹)	0,40 µl	0,40 µl
Celk. objem Mx pro jednu reakci	18,00 µl	10,00 µl

Kromě klasické PCR jsem využívala i real-time PCR prováděnou na přístroji Rotor-Gene 3000 (Corbet Research, Austrálie). Složení master mixu pro obě kola klasické nested PCR prováděné na Rotor-Gene 3000 popisuje tabulka 5.

Tab. 5: Složení master mixu (Mx) pro jednu reakci, klasická nested PCR, obě kola, Rotor-Gene 3000.

Komponenty Mx	I. kolo	II. kolo
PCR H ₂ O	16,92 µl	18,17 µl
10x Taq pufr Complete (15 mM MgCl ₂)	2,50 µl	2,40 µl
dNTPs (25 mM)	0,18 µl	0,15 µl
Primer 1 (100 µM)	0,25 µl	0,24 µl
Primer 2 (100 µM)	0,25 µl	0,24 µl
10x LC Green	2,50 µl	2,40 µl
Taq DNA polymeráza Unis (5 U.µl ⁻¹)	0,40 µl	0,40 µl
Celk. objem Mx pro jednu reakci	23,00 µl	24,00 µl

Tab. 6: Složení master mixu (Mx) pro jednu reakci, nested PCR v jedné zkumavce, obě kola, Rotor-Gene 3000.

Komponenty Mx	I. kolo	II. kolo
PCR H ₂ O	16,92 µl	8,22 µl
10x Taq pufr Complete (15 mM MgCl ₂)	2,50 µl	1,20 µl
dNTPs (25 mM)	0,18 µl	0,24 µl
Primer 1 (100 µM)	0,25 µl	0,37 µl
Primer 2 (100 µM)	0,25 µl	0,37 µl
10x LC Green	2,50 µl	1,20 µl
Taq DNA polymeráza Unis (5 U.µl ⁻¹)	0,40 µl	0,40 µl
Celk. objem Mx pro jednu reakci	23,00 µl	12,00 µl

Při teplotě blízké 0 °C byly vypočítané objemy všech komponent vneseny do zkumavky Eppendorf o objemu 1,5 ml a poté 10 vteřin vortexovány.

Sestavení PCR směsi

Do tenkostěnných mikrozkuvek určených pro PCR byl napipetován příslušný objem master mixu potřebný pro jednu reakci. Reakční směs byla dokončena dodáním templátové DNA následovně:

U klasické nested PCR:

- Reakční směs pro 1. kolo: 48 µl Mx I + 2 µl příslušného roztoku templátové DNA (viz tab. 1)
- Reakční směs pro 2. kolo: 49 µl Mx II + 1 µl produktů z 1. kola PCR

U nested PCR v jedné zkumavce:

- Reakční směs pro 1. kolo: 18 µl Mx I + 2 µl příslušného roztoku templátové DNA
- Reakční směs pro 2. kolo: 10 µl Mx II přidat k PCR směsi z 1. kola

U real-time klasické nested PCR:

- Reakční směs pro 1. kolo: 23 μl Mx I + 2 μl příslušného roztoku templátové DNA
- Reakční směs pro 2. kolo: 24 μl Mx II + 1 μl produktů z 1. kola PCR

U real-time nested PCR v jedné zkumavce:

- Reakční směs pro 1. kolo: 23 μl Mx I + 2 μl příslušného roztoku templátové DNA
- Reakční směs pro 2. kolo: 12 μl Mx II přidat k PCR směsi z 1. kola

Nakonec byla reakční směs promíchána a převrstvena 50 μl PCR oleje. Celý tento krok byl opět prováděn v chladícím bloku.

PCR amplifikace

Zkumavky byly vloženy do termocykleru, který byl předem přehřán na 95 °C. Samotná amplifikace probíhala dle parametrů, jež popisuje tabulka 7 a 8.

Tab. 7: Parametry nested PCR prováděné na Robocycleru Gradient 96.

Počet cyklů	Název cyklu	Parametry (teplota, čas)
1	Úvodní denaturace	95 °C, 5 min
30	Denaturace	95 °C, 1 min
	Nasedání primerů	57 °C*, 45 s
	Extenze	72 °C, 1 min 30 s
1	Finální extenze	72 °C, 5 min

*Teplota nasedání primerů byla při optimalizaci nested PCR měněna. Viz kapitola Optimalizace podmínek nested PCR v oddílu Výsledky a diskuze.

Celková doba PCR byla 1 hod 52 min.

Tab. 8: Parametry nested PCR prováděné na Rotorgene 3000

Počet cyklů	Název cyklu	Parametry (teplota, čas)
1	Úvodní denaturace	95 °C, 5 min
50	Denaturace	95 °C, 15 s
	Nasedání primerů	57 °C, 15 s
	Extenze	72 °C, 20 s
1	Finální extenze	72 °C, 5 min

Celková doba PCR byla 51 min 40 s.

Optimalizace podmínek nested PCR

Zvýšení citlivosti jsem se snažila dosáhnout změnou podmínek amplifikační reakce, konkrétně úpravou teploty annealingu, koncentrace hořčíku a koncentrace primerů v PCR směsi. Postupně bylo optimalizováno nejdříve 1. kolo nested PCR, následně i 2. kolo. Byly vždy vybrány podmínky, při kterých PCR dosahovala nejvyšší citlivosti. Do amplifikačních reakcí bylo vnášeno 1 ng, 100 pg, 10 pg, 2 pg, 400 fg, 40 fg, 4 fg nebo 0,4 fg izolované DNA *Candidy albicans*. Tyto množství DNA byly zvoleny na základě článku Kanbe et al.: PCR based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes.

Dále jsem hodnotila vliv přidání PCR enhanceru do reakční směsi na výtěžnost amplifikační reakce a testovala nový postup při provádění uhnížděné PCR tzv. nested PCR v jedné zkumavce. Při tomto uspořádání bylo třeba rozhodnout, jaký objem reakční směsi v 2. kole, resp. jaké nařazení produktů a složek reakce z 1. kola je nejvýhodnější z hlediska citlivosti PCR

Při nested PCR v jedné zkumavce byly v 2. kole použity vnitřní primery ukončené na 5' konci fosfátem, aby byly chráněny před exonukleázovou aktivitou Taq polymerázy. Dále bylo prováděno srovnání citlivosti nested PCR v jedné zkumavce při použití vnitřních na 5' konci fosforylovaných a nefosforylovaných primerů.

PCR enhancer

PCR enhancer od firmy Top Bio je 0,1 M tetramethylammonium oxalát, který podle údajů výrobce dokáže odstranit nežádoucí nespecifity PCR a zvýšit množství produktu amplifikační reakce. Tento enhancer je dodáván v kvalitě vhodné pro přímé přidání do reakční směsi pro PCR.

Podle protokolu doporučeného výrobcem jsem PCR enhancer přidávala v ředění 1:50 do reakční směsi. Při konečném objemu reakční směsi 50 μl jsem použila 1 μl PCR enhanceru a o 1 μl méně PCR vody.

Optimalizace objemu PCR směsi v 2. kole u nested PCR v jedné zkumavce

Objem PCR směsi v 1. kole byl 20 μl , v druhém kole byla testována výhodnost naředění reakční směsi na 30 μl , 40 μl a 50 μl versus stav s pouhým přidáním komponent potřebných pro 2. kolo (vnitřní primery, nukleotidy a Taq polymeráza) bez dalšího naředění produktů 1. kola.

Protože výše uvedené uspořádání pokusu nepřineslo jednoznačné výsledky, následovalo hodnocení naředění produktů 1. kola na 25 μl , 30 μl , 35 μl v 2. kole vs. stav bez naředění. Množství zamplifikované DNA bylo hodnoceno po 20 a 30 proběhlých cyklech 2. kola.

Hodnocení specifity nested PCR

Po úpravě podmínek amplifikace je nutné otestovat specifitu reakce. Specifita nested PCR byla testována sérií paralelních amplifikačních reakcí s následujícími zástupci rodu *Candida*: *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* a *Candida parapsilosis*. V každé sérii byla vždy jedna reakce, do které bylo vnášeno 400 fg izolované DNA *C. albicans*, a čtyři reakce, ve kterých bylo podrobena amplifikaci 20 ng genomové DNA zbylých čtyř zástupců rodu *Candida* s párem vnitřních primerů specifických pro druh *C. albicans*.

Elektroforéza

Příprava gelu

Pro dělení produktů vzniklých při nested PCR byl použit 2 % agarózový gel, který obsahoval ethidium bromid ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 1x TBE pufr.

Směs práškové agarózy a 1x TBE byla povařena v mikrovlnné troubě Clatronic, až se agaróza zcela rozpustila. Po ochladnutí směsi na $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo přidáno příslušné množství ethidium bromidu a gel byl nalit do elektroforetické vany Easy Cast – horizontal electrophoresis system (model #B2 a B1A, Owl, USA).

Gel je potřeba nechat dostatečně ztuhnout, nejméně 2 hodiny. Tuhnutí lze urychlit ochlazením gelu v ledničce. Po ztuhnutí se gel převrství 1x TBE pufr.

Nanášení produktů PCR na gel

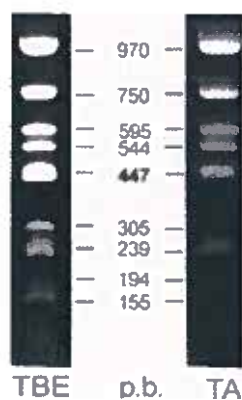
Ze zkumavky bylo odebráno $15 \mu\text{l}$ vzorku obsahujícího zamplifikovanou DNA a špičkou promícháno s $3 \mu\text{l}$ nanášecího pufru (0,25 % bromfenolové modři, 40 % sacharózy v ddH_2O). Tato směs byla nanesena do příslušné jamky v gelu. Do jedné či dvou jamek v gelu byly naneseny $3 \mu\text{l}$ markeru 155 – 970 (Top-Bio, ČR), které byly smíchány s $1 \mu\text{l}$ nanášecího pufru. Dělení probíhalo při napětí 5 V na každý centimetr vzdálenosti mezi elektrodami po dobu minimálně 60 minut (zdroj napětí: Apelex electrophoresis power supply ST 606T, Apelex, Francie).

Hodnocení elektroforézy a velikosti amplifikovaných DNA fragmentů

Vizualizace DNA proběhla pomocí UV transluminátoru (Electronic MultiWave Transilluminator, Ultra-Lum, USA). Obsah transluminátoru snímala kamera, která byla propojena s počítačem. Obrazy gelů byly dokumentovány softwarem ScionImage (Scion, USA) a ukládány ve formátu bitmapy.

Velikost DNA fragmentů generovaných v nested PCR byla odhadnuta na základě srovnání těchto fragmentů s fragmenty DNA o známé velikosti obsažených v DNA markeru. Za předpokladu, že velikost produktů uhnížděné PCR by neměla

přesáhnout rozmezí 200 – 900 bp, byl k tomuto účelu zvolen DNA marker 155 – 970 (viz obr. 5), jehož DNA fragmenty tuto oblast pokrývají.



Obr. 5: Velikosti fragmentů DNA markeru 155-970 firmy Top-Bio (ČR).

Fragmenty byly separovány ve 2 % agarózovém gelu, který obsahoval ethidium bromid $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 1 x TBE pufr. Na základě rozložení a výskytu pruhů v jednotlivých drahách a jejich intenzity byla vyhodnocena citlivost a specifita metody.

Výsledky a diskuze

Při své práci jsem navazovala na výsledky Mgr. Petry Sehnalíkové, která ve své diplomové práci testovala citlivost a specifitu uhnížděné PCR využívající univerzální a druhově specifické primery navržené skupinou Kanbe et al. Toto uspořádání nested PCR vykazovalo vysokou specifitu, ale nízkou citlivost – hranice *in vitro* citlivosti se pohybovala mezi 200 až 20 pg DNA vnášené do reakce. Mým úkolem bylo citlivost detekční metody zvýšit.

Použití PCR enhanceru

PCR enhancer byl přidán podle doporučení výrobce v množství 1 μl do reakční směsi v 1. i 2. kole.

Výsledek pokusu znázorňují obrázky 6 a 7. Nepotvrdilo se, že by přidavek PCR enhanceru zvyšoval citlivost amplifikace, naopak se zdá, že jeho přítomnost výtežnost nested PCR snižuje. Band v dráze odpovídající 1 ng templátové DNA vnášenému do 1. kola nested PCR je výraznější v případě, že nebyl použit PCR enhancer. V tomto případě je na gelu velmi slabě patrný i band v dráze odpovídající 100 pg templátové DNA.

Množství templátové DNA vnesené do reakce je uvedeno v horní části dráhy (n značí negativní kontrolu), v drahách značených M byl dělen DNA marker 155 – 970, 2 % agarózový gel s obsahem EtBr ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).



Obr. 6: Citlivost nested PCR bez použití PCR enhanceru.



Obr. 7: Citlivost nested PCR s použitím PCR enhanceru.

PCR enhancer je primárně určen ke zvýšení specifity PCR reakce, která není optimalizována. Jeho použití může být výhodné ve výzkumných laboratořích, které používají PCR amplifikaci především v mnoha variantách s nově navrženými primery, takže použití enhanceru může šetřit čas a materiál, potřebný k optimalizaci podmínek reakce. V našem případě byl použit u reakční směsi již optimalizované, proto pravděpodobně nejen nepřinesl zvýšení výtěžnosti a citlivosti, ale zřejmě i negativně ovlivnil optimalizovaný systém. Je možné, že další optimalizace by přinesla zvýšení výtěžnosti při použití PCR enhanceru. Protože ale jeho efekt byl v základním uspořádání spíše negativní, je málo pravděpodobné, že by toto zvýšení výtěžnosti mohlo být výrazné. Proto jsem podmínky použití PCR enhanceru již dále neoptimalizovala a pokusila jsem se citlivost zvýšit tradiční optimalizací tří parametrů reakce – koncentrace hořčíku, teploty nasedání primerů a množství primeru.

Optimalizace podmínek nested PCR

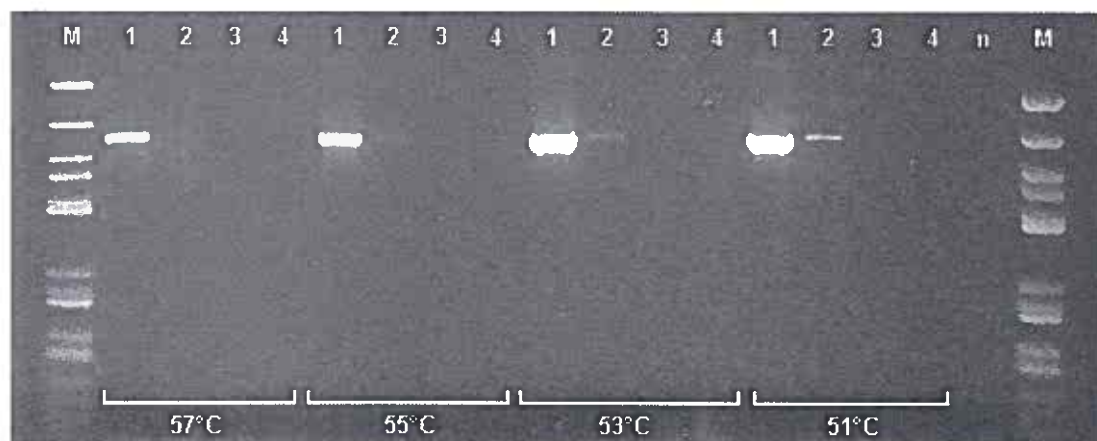
Optimalizace podmínek 1. kola

Výtěžnost a citlivost PCR lze obecně zvýšit snížením teploty nasedání, protože dochází ke snadnějšímu nasedání primerů na komplementární úseky templátové DNA a ke zvýšení stability hybridů templátová DNA-primer. Snížení teploty nasedání ovšem

zároveň snižuje specifitu reakce, protože primery mohou nasedat i na úseky templátové DNA, které nejsou dokonale komplementární. Přílišné snížení pak může vést nejen k tvorbě nespecifických produktů, ale i k vymizení tvorby produktu rozlišitelného elektroforézou v gelu, protože nasedání primerů na příliš mnoha místech genomu může bránit efektivní amplifikaci.

Pro optimalizaci teploty nasedání primerů byla s výhodou využita schopnost termocykleru Robocycler Gradient 96 (Stratagene, USA) vytvořit teplotní gradient v jamkách bloku, ve kterém dochází k nasedání primeru. Temperování tohoto bloku bylo nastaveno na gradient 47 – 58 °C, přičemž byly při pokusu testovány teploty 51 °C, 53 °C, 55 °C a 57 °C (= teplota nasedání při původních podmínkách reakce).

Zjištěnou citlivost detekce při různých teplotách nasedání primeru zachycuje obrázek 8. Nejvyšší citlivost nested PCR byla zaznamenána při použití teploty annealingu 51 °C, proto byla v dalších experimentech upravena teplota nasedání primeru na tuto hodnotu.

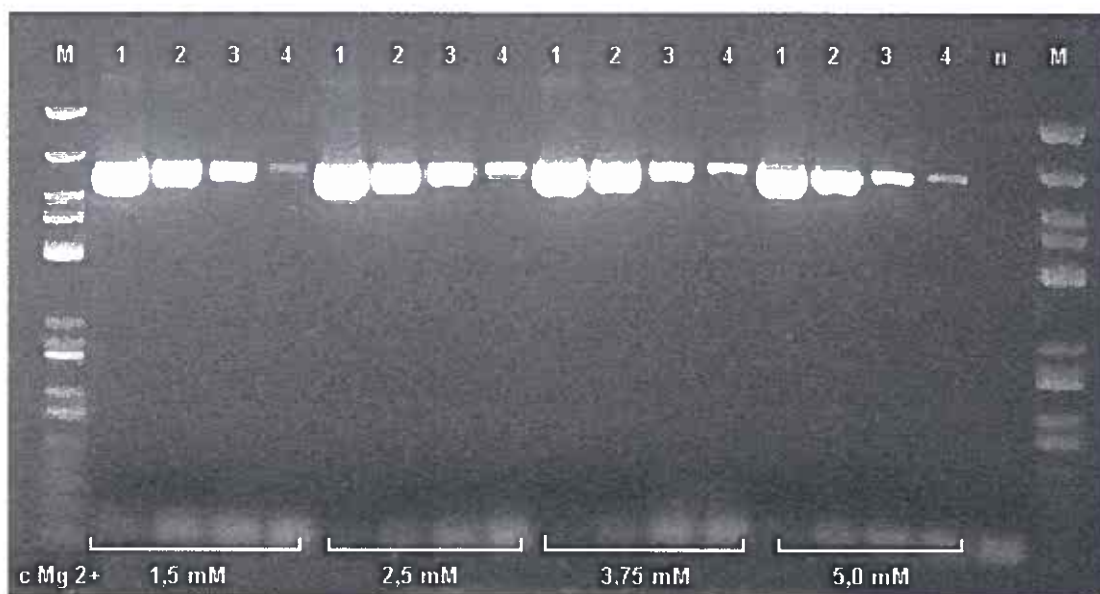


Obr. 8: Optimalizace teploty nasedání v 1. kole – citlivost detekce při teplotách nasedání 51 °C, 53 °C, 55 °C a 57 °C (= původní teplota nasedání). Množství genomové DNA vnesené do reakce bylo následující: dráha 1 – 1 ng, dráha 2 – 100 pg, dráha 3 – 10 pg, dráha 4 – 2 pg, n značí negativní kontrolu, v drahách značených M byl dělen DNA marker 155 – 970, 2 % agarózový gel s obsahem EtBr (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Další možností, jak zvýšit výtěžnost a citlivost PCR reakce, je zvýšení koncentrace Mg^{2+} iontů, které fungují jako kofaktor Taq-polymerázy, takže zvyšují její procesivitu, a také stabilizují interakci primer-templátová DNA. Tím ovšem zároveň

snižují specifitu nasedání primerů, podobně jako snížení teploty. Při původním uspořádání nested PCR bylo do reakční směsi o celkovém objemu 50 μ l přidáváno 5 μ l 10x Taq pufr Complete obsahujícího standartně 15 mM $MgCl_2$, což znamená, že výsledná koncentrace hořčíku ve směsi byla 1,5 mM. Testovány byly zvýšené koncentrace hořčíku 2,5 mM, 3,75 mM a 5,0 mM ve srovnání s původní koncentrací 1,5 mM.

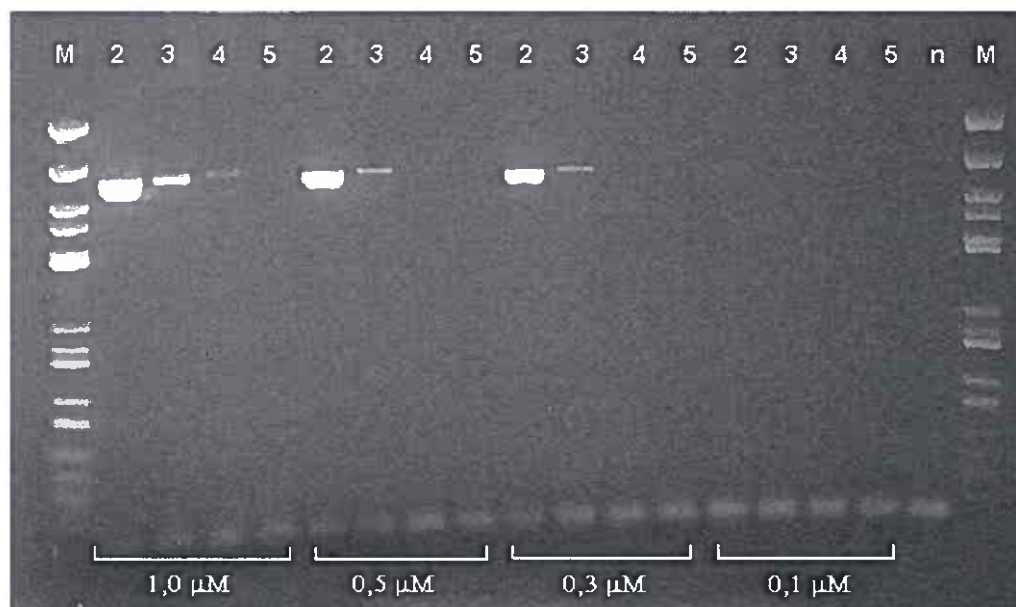
Výsledek optimalizace koncentrace hořčíku v 1. kole nested PCR ukazuje obrázek 9. Nejvyšší citlivost vykazovala amplifikační reakce při koncentracích hořčíku 2,5 mM a 3,75 mM. Pro použití do dalších pokusů byla zvolena koncentrace 2,5 mM z důvodu větší specifity při zachování dobré citlivosti.



Obr. 9: Optimalizace koncentrace hořčíku v reakční směsi pro 1. kolo – citlivost detekce při koncentracích hořčíku 1,5 mM (= původní koncentrace hořčíku odpovídající Taq Buffer Complete), 2,5 mM, 3,75 mM a 5,0 mM. Množství genomové DNA vnesené do reakce viz legenda u obr. 8.

Jako třetí standardní způsob zvýšení výtěžnosti a citlivosti PCR reakce se používá optimalizace koncentrace primerů, které jsou běžně přidávány do reakce v nadbytku, v důsledku čehož dochází ke kompetici primerů při nasedání a následném snížení citlivosti amplifikace. Proto jsem zkoušela snížit množství vnějších primerů vnášených do 1. kola nested PCR. Testovány byly koncentrace 0,1 μ M, 0,3 μ M, 0,5 μ M ve srovnání s původní koncentrací primerů 1,0 μ M.

Výsledek zachycuje obrázek 10. Jako nejvýhodnější se ukázala původní koncentrace primerů, její snížení vedlo ve všech případech ke snížení výraznosti pruhů na gelu, proto byla do dalších pokusů ponechána původní koncentrace vnějších primerů.



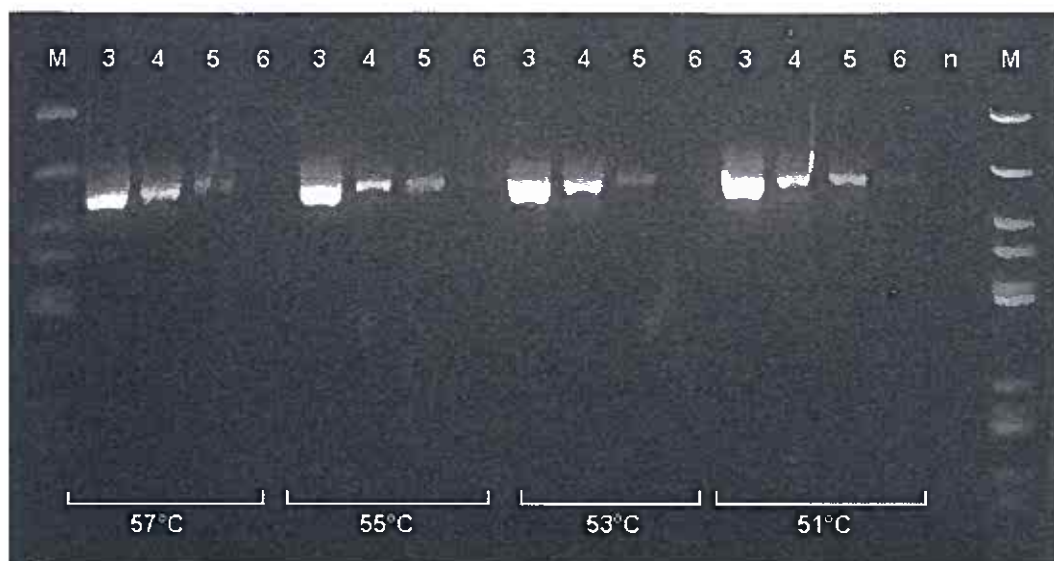
Obr. 10: Optimalizace koncentrace primerů v reakční směsi pro 1. kolo – citlivost detekce při koncentracích primerů 0,1 μM , 0,3 μM , 0,5 μM , 1,0 μM (= původní koncentrace primerů v reakční směsi).. Množství genomové DNA vnesené do reakce bylo následující: dráha 2 – 100 pg, dráha 3 – 10 pg, dráha 4 – 2 pg, dráha 5 – 400 fg, n značí negativní kontrolu, v drahách značených M byl dělen DNA marker 155 – 970, 2 % agarózový gel s obsahem EtBr ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Optimalizace podmínek 2. kola

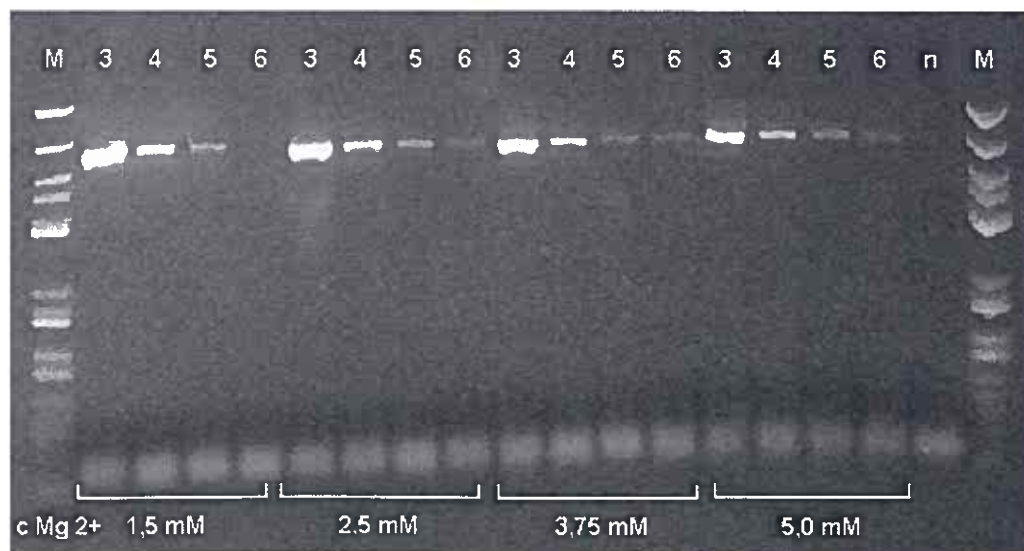
Při optimalizaci podmínek 2. kola nested PCR bylo postupováno stejně jako při optimalizaci podmínek 1. kola. I dosažené výsledky byly obdobné. Jako nejvýhodnější byla vybrána teplota nasedání 51 $^{\circ}\text{C}$, koncentrace hořčíku 2,5 mM a koncentrace vnitřních primerů byla ponechána na původní hodnotě 1,0 μM . Do druhého kola byly vnášeny produkty 1. kola proběhlého za optimalizovaných podmínek.

Citlivost detekce kandidové DNA při teplotách nasedání primeru 51 $^{\circ}\text{C}$, 53 $^{\circ}\text{C}$ a 55 $^{\circ}\text{C}$ vs. původní teplota nasedání 57 $^{\circ}\text{C}$ zachycuje obrázek 11, při koncentracích hořčíku 2,5 mM, 3,75 mM a 5,0 mM vs. původní koncentrace 1,5 mM obrázek 12,

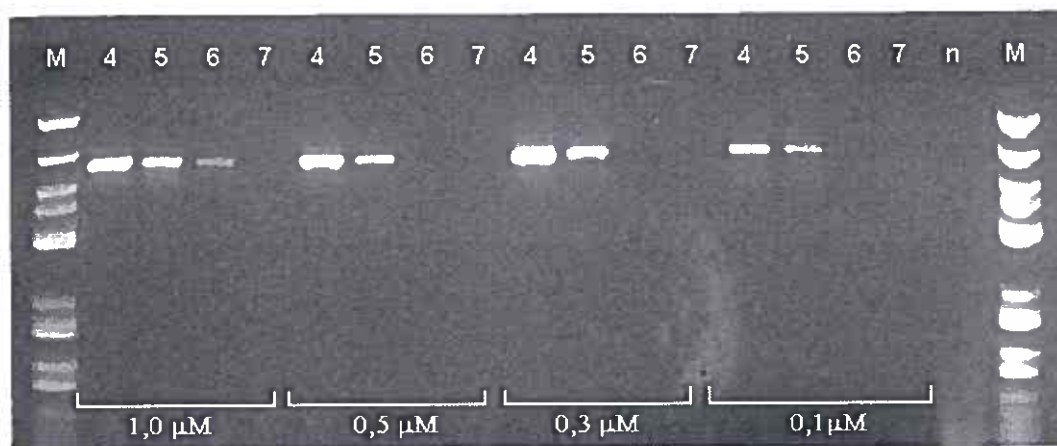
při koncentracích vnitřních primerů 0,1 μM , 0,3 μM a 0,5 μM vs. původní koncentrace 1,0 μM obrázek 13.



Obr. 11: Optimalizace teploty nasedání ve 2. kole – citlivost detekce při teplotách annealingu 51 °C, 53 °C, 55 °C a 57 °C (= původní teplota nasedání). Množství genomové DNA vnesené do reakce bylo následující: dráha 3 – 10 pg, dráha 4 – 2 pg, dráha 5 – 400 fg, dráha 6 – 40 fg, n značí negativní kontrolu, v drahách značených M byl dělen DNA marker 155 – 970, 2 % agarózový gel s obsahem EtBr ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).



Obr. 12: Optimalizace koncentrace hořčíku v reakční směsi ve 2. kole – citlivost detekce při koncentracích hořčíku 1,5 mM (= původní koncentrace hořčíku odpovídající Taq Buffer Complete), 2,5 mM, 3,75 mM a 5,0 mM. Množství genomové DNA vnesené do reakce viz legenda u obr. 11.



Obr. 13: Optimalizace koncentrace primerů v reakční směsi ve 2. kole – citlivost detekce při koncentracích primerů 0,1 μM , 0,3 μM , 0,5 μM , 1,0 μM (= původní koncentrace primerů v reakční směsi). Množství genomové DNA vnesené do reakce bylo následující: dráha 4 – 2 pg, dráha 5 – 400 fg, dráha 6 – 40 fg, dráha 7 – 4 fg, n značí negativní kontrolu, v drahách značených M byl dělen DNA marker 155 – 970, 2 % agarózový gel s obsahem EtBr ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Citlivost nested PCR po optimalizaci

Tabulka č. 9 shrnuje změny podmínek amplifikace po optimalizaci.

Tab. 9: Podmínky amplifikace před a po optimalizaci. Hodnoty jsou pro obě kola nested PCR stejné.

	před optimalizací PCR	po optimalizaci PCR
teplota nasedání	57 °C	51 °C
koncentrace hořčíku v reakci	1,5 mM	2,5 mM
koncentrace primerů v reakci	1,0 μM	1,0 μM

Úpravou teploty annealingu a koncentrace hořčíku se podařilo zvýšit citlivost nested PCR tak, že je možné zachytit DNA *Candidy albicans* při množství 40 fg vnášeném do reakce (obr. 14). Oproti původně dosahované citlivosti 100 pg – 1 ng to představuje zvýšení citlivosti 2 500-25 000 \times , tedy o 3-4 řády. Množství 40 fg

reprezentuje přibližně 2 kopie genomu *C. albicans*, optimalizovaná metoda se tedy pohybuje na hranici detekční schopnosti pro gen vyskytující se v genomu v 1 kopii.



Obr. 14: Citlivost nested PCR po optimalizaci podmínek amplifikace. Množství templátové DNA vnesené do reakce je uvedeno v horní části dráhy, n značí negativní kontrolu, v drahách značených M byl dělen DNA marker 155 – 970, 2 % agarózový gel s obsahem EtBr ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Specifita optimalizované nested PCR pro druh *Candida albicans*

Protože snížením teploty nasedání primerů a zvýšením koncentrace hořečnatých kationtů dochází vždy k určitému snížení specifity amplifikace, bylo nezbytné ověřit, zda toto snížení nevede ke snížení schopnosti primerového systému rozlišit různé druhy patogenních kandid. Zkouška specifity nested PCR byla provedena s DNA druhů *C. albicans*, *tropicalis*, *glabrata*, *parapsilosis* a *krusei* za použití nespecifických vnějších primerů v 1. kole a vnitřních primerů specifických pro druh *C. albicans* ve 2. kole. Obě kola proběhla za optimalizovaných podmínek. Množství DNA vnášené do reakce bylo 400 fg u *C. albicans*, což je dvojnásobek zjištěného detekčního limitu, který zaručuje reprodukovatelnost, a 20 ng u ostatních druhů kandid, což je výrazný nadbytek, který se ovšem ve vyšetřovaném vzorku může u výrazných kandidemií vyskytnout.

Výsledek testu specifity znázorňuje obrázek 15. Nested PCR prováděná za optimalizovaných podmínek není specifická pro druh *C. albicans* narozdíl

od původního uspořádání. Produkty o délce specifické pro *C. albicans* vznikají, i když je do reakce vnášena DNA ostatních druhů. Z výše uvedeného vyplývá, že se optimalizací podmínek reakce podařilo zvýšit o několik řádů citlivost PCR, ovšem snížení specifity bylo natolik výrazné, že umožnilo efektivní vazbu primerů na homologní nedokonale komplementární sekvence genu pro topoizomerázu 2, takže vzniká homologní produkt i u jiných druhů patogenních kandid. Tento efekt znehodnocuje hlavní výhodu primerového systému vyvinutého Kanbe et al. (2002), tj. jeho schopnost spolehlivě rozlišit jednotlivé druhy patogenních kvasinek a poskytnout tak již v okamžiku detekce podpůrnou informaci pro volbu racionální antimykotické terapie.



Obr. 15: Druhová specifita amplifikační reakce prováděné za optimalizovaných podmínek. Dráhy, ve kterých byly děleny produkty nested PCR, jsou označeny zkratkami názvů druhů, jejichž DNA byla vnášena do reakce: dráha C. alb. – *C. albicans*; dráha trop. – *C. tropicalis*; dráha glab. – *C. glabrata*; dráha par. – *C. parapsilosis*; dráha krus. – *C. krusei*; n značí negativní kontrolu. V dráhách značených M byl dělen DNA marker 155 – 970.

Nested PCR v jedné zkumavce

Vzhledem ke kontraproduktivnímu účinku zvýšení výtěžnosti a citlivosti nested PCR tradičními postupy jsem hledala alternativní způsoby dosažení stejného cíle při zachování specifity detekce. Uhnížděná PCR se tradičně provádí dvoukolově tak, že minimální množství reakční směsi po 1. kole – obvykle 1 μ l – je přidáváno do reakční směsi pro 2. kolo. Tímto postupem dochází k odstranění nevýhody klasické,

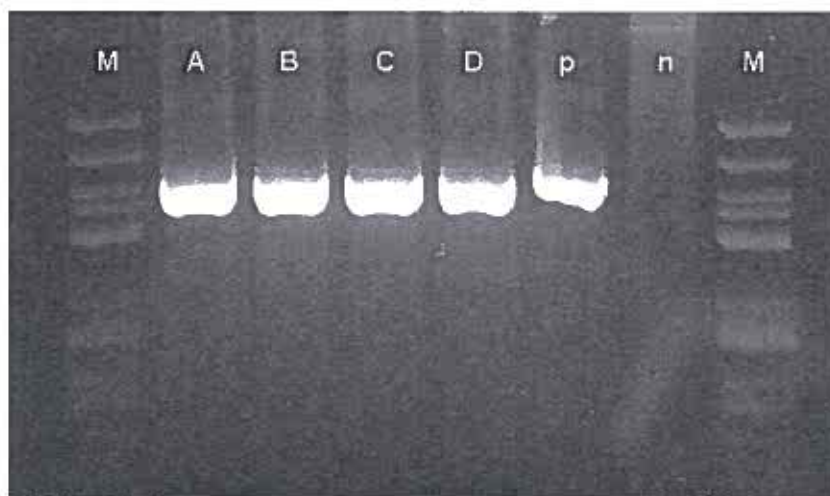
tzv. end-point PCR, ve které nelze dosáhnout další amplifikace produktu nad určitou úroveň pouhým přidáním dalších cyklů PCR. Toto omezení je dáno především interferencí produktu amplifikace s nasedáním primerů (shodné koncové sekvence) a zčásti také klesající aktivitou Taq-polymerázy po opakovaných poškozeních vysokou teplotou při denaturaci DNA. Přenesením pouze 1 μ l produktů 1. kola do nové reakční směsi dochází k naředění produktu a zároveň k obnově Taq polymerázy a doplnění dalších složek reakce. Zároveň tím ale dochází i ke ztrátě 98 % produktů 1. kola, které by mohly být amplifikovány ve 2. kole (ztráta 49 μ l produktů z 50 μ l v naší modifikaci reakce).

Položila jsem si proto otázku, zda by nebylo možné zvýšit výtěžnost a citlivost reakce, pokud by bylo do reakční směsi pro 2. kolo přidáváno větší množství produktů 1. kola. Zároveň jsem vzala v úvahu fakt, že manipulace s produkty 1. kola s sebou přináší hlavní nevýhodu nested PCR, kterou je riziko křížové kontaminace vzorků. Proto jsem testovala možnost vnášet nové reakční komponenty přímo do reakční směsi po skončení 1. kola, což by mohlo vést k žádoucímu naředění produktu a obnově složek reakční směsi při nižším riziku křížové kontaminace. V literatuře je popsán podobný postup „one-tube nested PCR“ zejména u detekce mykobakterií pro podmínky laboratoří rozvojových zemí, kde je obtížné efektivně zabránit křížové kontaminaci (Wilson et al., 1993).

Odlišnost „one-tube nested PCR“ od klasické nested PCR spočívá v tom, že celý objem reakční směsi z 1. kola, tzn. všechny produkty vzniklé v první amplifikační reakci dvoukolové nested PCR, tvoří základ reakční směsi pro 2. kolo. Prakticky jsem jednozkumavkovou nested PCR prováděla tak, že k celému objemu reakční směsi 1. kola, který byl pro tuto modifikaci nested PCR upraven na 20 μ l, jsem po skončení 1. kola přidala nové reakční komponenty (Taq DNA polymerázu, vnitřní primery, nukleotidy), případně naředila puforem na požadovaný objem a tuto směs podrobila 2. kolu nested PCR. Podrobnější postup a přesné složení reakční směsi 1. kola i množství vnášených komponent k obnově reakční směsi před 2. kolem je uvedeno v oddílu Materiál a metodika, kapitola Sestavení Mastermixu.

Postup „one-tube nested PCR“ jsem prováděla za původních podmínek amplifikace, které zajišťovaly vysokou specifitu a spolehlivé rozlišení různých druhů

patogenních kandid při nízké citlivosti na úrovni 100 pg – 1 ng. Předpokládala jsem, že množství přidaného pufru pro 2. kolo tj. míra naředění směsi obsahující produkty z 1. kola by mohla ovlivnit výtěžnost reakce. Proto jsem provedla pokus, kdy v 1. kole byl objem reakční směsi vždy 20 μ l a před provedením druhého kola byly do směsi přidány (i) jen nové nukleotidy, Taq DNA polymeráza a vnitřní primery v takovém množství, aby v celkovém objemu dosáhly požadované koncentrace bez dalšího naředění puftrem (dráha A), nebo (ii) byla směs po dodání výše zmíněných složek naředěna puftrem na 30 μ l (dráha B), 40 μ l (dráha C) a 50 μ l (dráha D). Výsledky byly srovnávány s pozitivní kontrolou, kterou představovala nested PCR prováděnou klasickým způsobem tj. 1 μ l produktů 1. kola vneseno do 49 μ l Mastermixu pro 2. kolo. Do 1. kola reakce bylo vnášeno 2 pg templátové DNA *C. albicans* – viz obrázek 16.



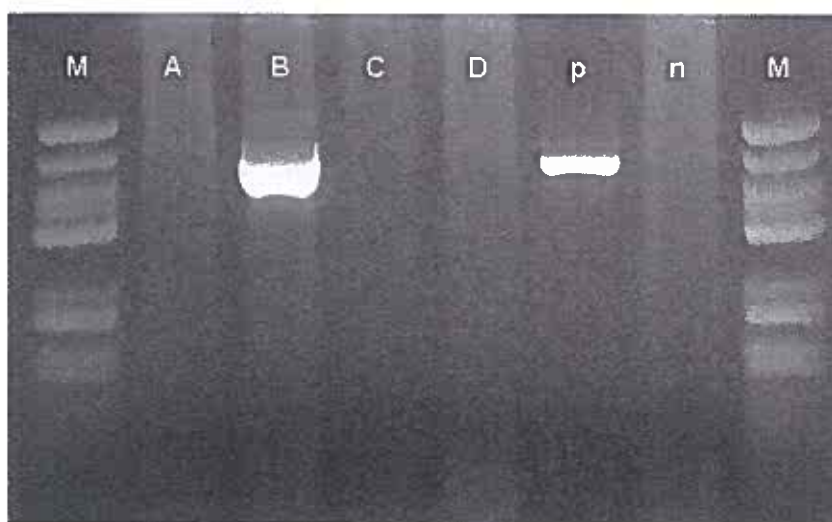
Obr. 16: Nested PCR v jedné zkumavce. Množství vnášené DNA 2 pg. Dráhy se od sebe liší objemem PCR směsi ve 2. kole nested PCR. Dráha A – bez ředění puftrem (celkový objem 21 μ l), dráha B – ředění na 30 μ l, dráha C – ředění na 40 μ l, dráha D – ředění na 50 μ l. V dráze označené p byly děleny produkty nested PCR v klasickém uspořádání, n značí negativní kontrolu. V drahách značených M byl dělen DNA marker 155 – 970.

Z tohoto pokusu nebylo možné vyvodit závěr, protože bandy v drahách A, B, C i D byly stejně výrazné, proto jsem pokus zopakovala, jedinou odlišností bylo množství vnášené DNA – bylo sníženo na 400 fg – viz obrázek 17.



Obr. 17: Nested PCR v jedné zkumavce. Množství vnášené DNA 400 fg. Legenda viz obrázek 16.

V tomto případě se objem reakční směsi ve 2. kole 21 μ l, představující prosté přidání nových stavebním kamenů PCR, ukázal jako nevýhodný, pruh byl podstatně slabší než v drahách B, C a D. Z toho se dá usuzovat, že určité naředění směsi z 1. kola může zlepšovat výtežnost amplifikační reakce. Nejvýraznější je pruh v dráze B představující naředění směsi 1. kola na 30 μ l, ovšem rozdíly v intenzitě tohoto pruhu oproti dalším dvěma v drahách C a D jsou nepatrné. Proto byl proveden tento pokus potřetí, tentokrát se 40 fg vnášené DNA – viz obrázek 18.



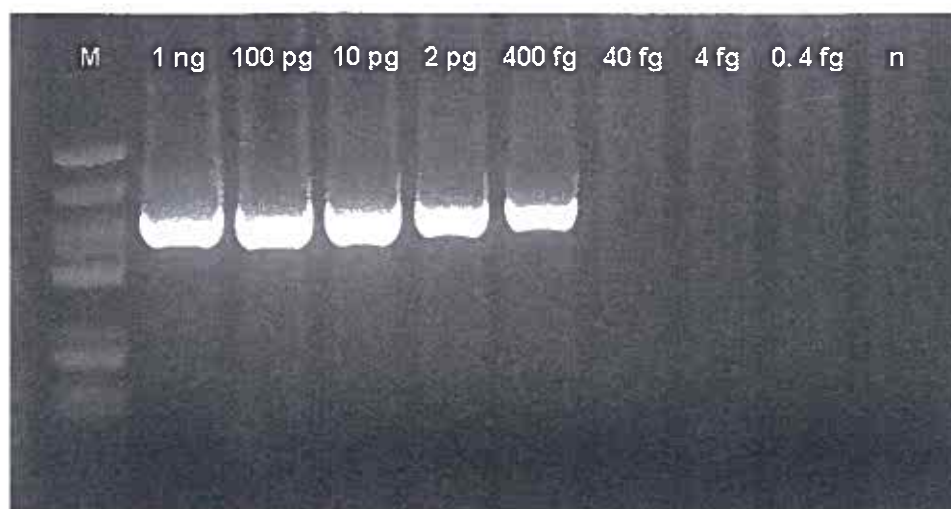
Obr. 18: Nested PCR v jedné zkumavce. Množství vnášené DNA 40 fg. Legenda viz obrázek 16.

Produkt viditelný na gelu vznikl pouze při naředění směsi 1. kola na 30 μ l a u nested PCR prováděné klasickým způsobem. Tento výsledek může být zapříčiněn tím, že objem 30 μ l ve 2. kole je optimální, ale může to být i důsledek velmi nízké koncentrace templátové DNA. Množství 40 fg představuje cca dvě kopie genomu kvasinky *Candida albicans*, což v mnoha případech není dostatečné pro úspěšnou ampifikaci. Při opakování tohoto pokusu byl výsledek odlišný, na gelu nebyl viditelný produkt ani u jedné dráhy včetně dráhy příslušející nested PCR prováděné klasickým způsobem.

End-point PCR bohužel neumožňuje přesnější kvantifikaci produktu, proto nelze zcela spolehlivě určit nejvhodnější objem přidávané reakční směsi pro 2. kolo. Přesto jsem na základě získaných výsledků zvolila do dalších pokusů jako pravděpodobně vhodný objem reakční směsi ve 2. kole 30 μ l, a to jednak kvůli výsledku pokusu z obrázku 17 a 18, druhak kvůli šetření složkami reakce.

Citlivost nested PCR v jedné zkumavce - tradičně optimalizované podmínky pro vyšší citlivost vs. podmínky zajišťující vysokou specifitu

V této sérii pokusů jsem srovnávala citlivost detekce kandidové DNA při použití nested PCR v jedné zkumavce za podmínek optimalizovaných tradičním způsobem ke zvýšení citlivosti a za původních podmínek zajišťujících vysokou specifitu tj. při parametrech používaných před optimalizací nested PCR prováděné klasickým způsobem. Tento způsob srovnání jsem použila proto, abych objektivně zjistila vliv jednozkumavkové PCR na zvýšení citlivosti za srovnatelných podmínek. Výsledky znázorňují obrázky 19 a 20.



Obr. 19: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce za podmínek optimalizovaných tradičním způsobem ke zvýšení citlivosti. Množství templátové DNA vnesené do reakce je uvedeno v horní části dráhy, n značí negativní negativní kontrolu, v drahách značených M byl dělen DNA marker 155 – 970, 2 % agarózový gel s obsahem EtBr ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).



Obr. 20: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce při původních podmínkách, zajišťujících vysokou specifitu. Legenda viz obrázek 19.

Mezi citlivostí detekce nested PCR v jedné zkumavce prováděné za optimalizovaných a původních podmínek překvapivě není žádný rozdíl. Znamená to, že zvýšení vstupního množství DNA z 1. kola pro 2. kolo $20\times$ ($20 \mu\text{l}$ vs. $1 \mu\text{l}$) přineslo zvýšení citlivosti minimálně $250\times$, nejvýše $2\,500\times$ oproti klasické dvouzkumavkové PCR prováděné za původních podmínek. Toto srovnání ovšem nemůže být přesné,

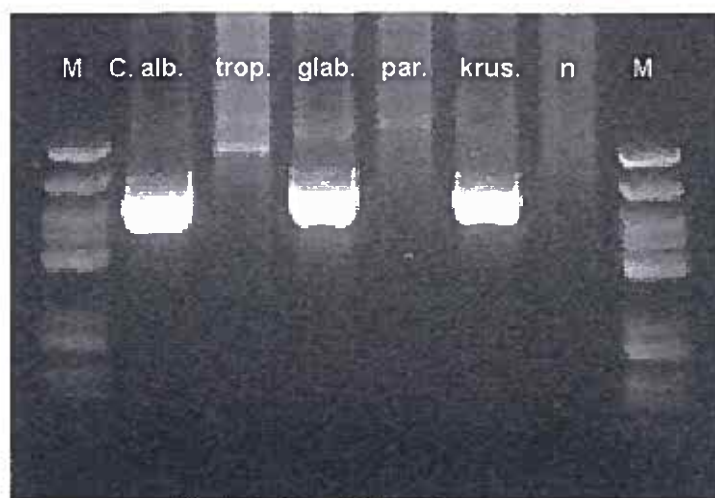
protože u genomové DNA může v průběhu skladování klesat množství, takže nelze spolehlivě srovnávat výsledky pokusů prováděných s delším časovým odstupem. V podmínkách pohybujících se na hranici detekčního limitu (40 fg) hraje roli i chyba ředění, protože se s určitou pravděpodobností zákonitě stává, že v konečném kroku ředění se v konkrétním vzorku nemusejí nacházet přesně 2 kopie genomu, ale i 1 nebo žádná, nebo 3 apod.

Důležitější je proto relativní srovnání, které jsme provedli ve výše ukázaném pokusu – na stejné ředící řadě dosáhla jednozkumavková PCR za původních specifických podmínek stejnou citlivost, jako jednozkumavková PCR za podmínek optimalizovaných pro vysokou citlivost, ale vedoucích k výraznému snížení specifity. Pro ověření, že upravený způsob provedení v jedné zkumavce neinterferuje s původně dosahovanou vysokou specifitou bylo samozřejmě nutné provést ještě kontrolní detekci s příbuznými druhy kandid

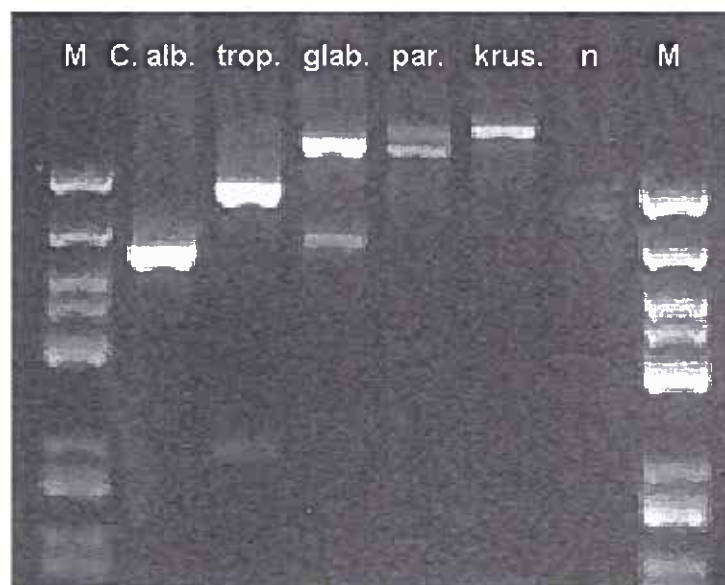
Specifita nested PCR v jedné zkumavce - optimalizované vs. původní podmínky

Srovnávala jsem specifitu amplifikační reakce při uspořádání nested PCR v jedné zkumavce za podmínek optimalizovaných pro vysokou citlivost a za původních podmínek zajišťujících vysokou specifitu – viz obr. 21 a 22.

Nested PCR probíhající za původních podmínek za původních podmínek zajišťujících vysokou specifitu tj. při teplotě nasedání 57 °C a koncentraci hořčíku odpovídající Taq Buffer Complete má vyšší specifitu než nested PCR probíhající za podmínek optimalizovaných pro vysokou citlivost, kdy vnitřní primery specifické pro *C. albicans* reagují i s druhy *C. glabrata* a *krusei* za vzniku produktu délky typické pro *C. albicans*. Naproti tomu při použití původních podmínek sice vnitřní primery reagují se všemi dalšími testovanými druhy kandid, ale podle různé délky produktu mohou být od sebe jednotlivé druhy bez větších problémů odlišeny.



Obr. 21: Specifita nested PCR v jedné zkumavce za podmínek optimalizovaných pro vysokou citlivost. Dráhy, ve kterých byly děleny produkty nested PCR, jsou označeny zkratkami názvů druhů, jejichž DNA byla vnášena do reakce: dráha C. alb. – *C. albicans*; dráha trop. – *C. tropicalis*; dráha glab. – *C. glabrata*; dráha par. – *C. parapsilosis*; dráha krus. – *C. krusei*; n značí negativní kontrolu. V drahách značených M byl dělen DNA marker 155 – 970.



Obr. 22: Specifita nested PCR v jedné zkumavce za původních podmínek zajišťujících vysokou specifitu. Legenda viz obr. 21.

Z výsledků je zřejmé, že provedení nested PCR v jedné zkumavce umožňuje dosáhnout citlivosti blízké teoretickému detekčnímu limitu jednokopiového genu při přijatelném snížení specifity (alternativní produkty u jiných druhů, obr. 22). Toto

snížení specifity ovšem nebrání jednoznačnému rozlišení lékařsky významných druhů patogenních kandid.

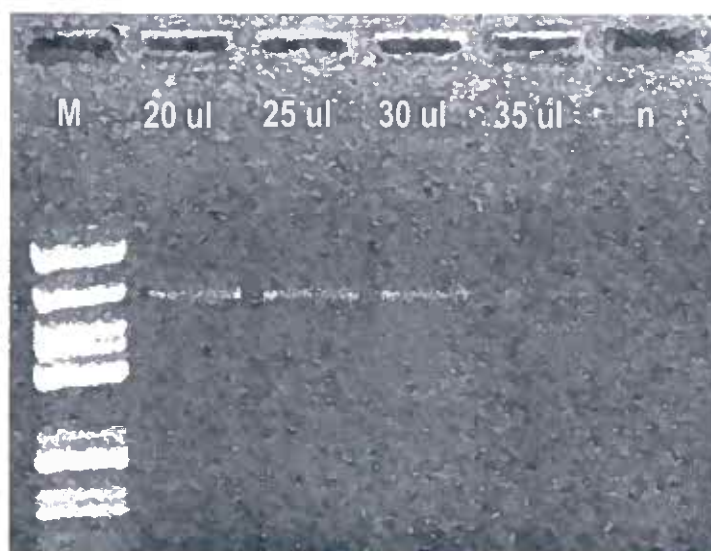
Citlivost nested PCR v jedné zkumavce s fosforylovanými a nefosforylovanými vnitřními primery

Pokud jsou při nested PCR v jedné zkumavce v reakční směsi 2. kola přítomny mimo vnitřních primerů i primery vnější, které zde zbyly z 1. kola, pak mohou vzhledem ke stejné teplotě nasedání nasedat na templát a zahajovat amplifikaci. Na stejném vlákně pak mohou být za sebou nasednuté dva primery. Protože Taq DNA polymeráza má 5'→3' exonukleázovou aktivitu, mohla by při zahájení syntézy od 3'-konce vnějšího primeru narazit na 5'-konec vnitřního primeru a odštěpit ho včetně produktu jeho extenze. Proto jsme předpokládali, že fosforylace na 5'-konci by měla vnitřní primery před 5'→3' exonukleázovou aktivitou Taq DNA polymerázy ochránit a zvýšit dále výtěžnost reakce.

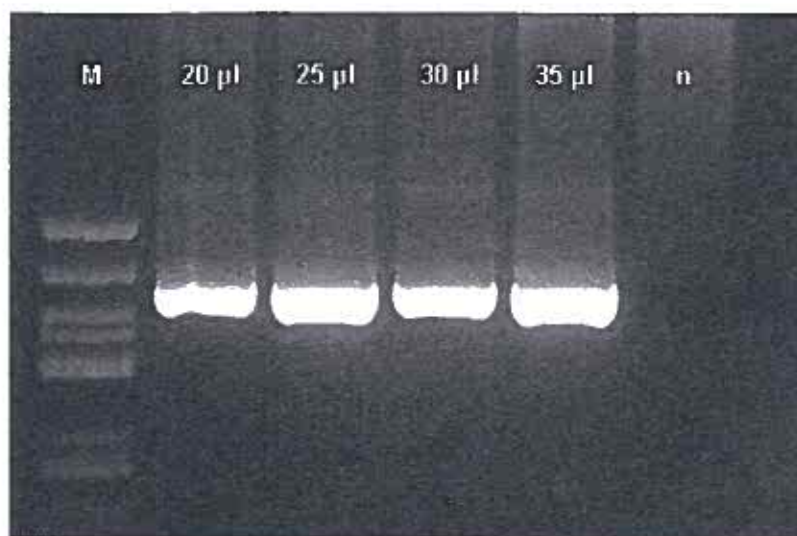
Srovnávala jsem citlivost detekce při použití nefosforylovaných a 5'-fosforylovaných vnitřních primerů, výtěžek 2. kola nested PCR jsem hodnotila po 20 a 30 proběhlých cyklech. Pro větší vypovídací hodnotu pokusu byly objemy použité ve 2. kole různé – od 20 μ l, kdy je citlivost nested PCR v jedné zkumavce nejnižší, po 30 μ l, kdy tato detekční metoda vykazovala citlivost nejvyšší. Do 1. kola bylo vnášeno 400 fg templátové DNA. Výsledek popisují obrázky 23 až 26.



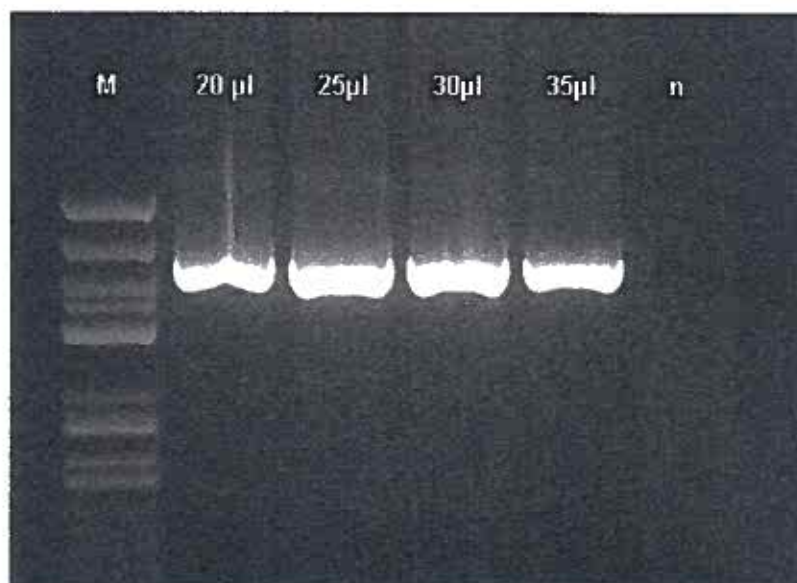
Obr. 23: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce po 20 cyklech 2. kola za použití nechráněných primerů. Objem reakční směsi ve 2. kole je uveden v horní části dráhy, n značí negativní kontrolu, v drahách značených M byl dělen DNA marker 155 - 970.



Obr. 24: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce po 20 cyklech 2. kola za použití chráněných primerů. Legenda viz obrázek 23. Pozn.: Protože pruhy jsou velmi slabé a byly viditelné jen při digitálním zobrazení, nikoli na výtisku z běžné laserové tiskárny, byla fotografie upravena pro maximální zvýšení „čitelnosti“. Cenou za tuto úpravu je ovšem vysoká zrnitost, protože dokumentační systém, který jsme měli k dispozici, disponuje jen rozlišením 640 × 480 bodů.



Obr. 25: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce po 30 cyklech 2. kola za použití nechráněných primerů. Legenda viz obrázek 23.



Obr. 26: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce po 20 cyklech 2. kola za použití chráněných primerů. Legenda viz obrázek 23.

Po 20 proběhlých cyklech 2. kola je vidět rozdíl v citlivosti reakce – při použití 5'-fosforylovaných primerů je citlivost reakce vyšší. Po 30 proběhlých kolech už rozdíl vidět není, bandy jsou v obou případech stejně intenzivní (projev end-point PCR). Deset kol PCR stačí k dohnání rozdílu ve výtěžnosti amplifikační reakce při použití nefosforylovaných primerů.

Určení vlivu fosforylace primerů na citlivost detekce je ale při použití end-point PCR s množstvím templátové DNA blízcím se detekčnímu limitu problematické. Na variabilitu výsledků může mít vliv chyba při ředění, kterou jsme se snažili minimalizovat použitím stejné ředící řady v Master-mixu obou reakcí, přesto nelze vliv náhody vyloučit. Proto jsem se výsledek snažila verifikovat použitím PCR v reálném čase, pro kterou se podařilo na omezenou dobu zapůjčit přístroj RotorGene 3000.

Bohužel se mi za tuto krátkou dobu nepodařilo získat jednoznačné výsledky, které by potvrzovaly či zpochybňovaly kladný vliv fosforylace primerů na citlivost amplifikační reakce. Neúspěch pokusu připisuji jednak tomu, že není možné metodu, která byla zoptimalizovaná pro provedení na klasickém termocykleru, převést na jiný typ přístroje bez opětovného upravení podmínek, zvláště je třeba stanovit optimální dobu trvání jednotlivých kroků amplifikace, které se pohybuje v řádu vteřin (oproti minutám u termocykleru), a druhá tomu, že bych potřebovala získat více praktických zkušeností v práci s real-time cyklerem. Proto bude třeba se tomuto problému věnovat v budoucnu.

Toothpick PCR

Testovaný systém nested PCR (Kanbe et al., 2002) lze s výhodou použít nejen k rychlé a specifické detekci DNA patogenních kandid z klinického vzorku, ale i k určení izolátu, příp. i složek smíšené kultury po primoizolaci. Rychlost určení je pak dána nejen časovou náročností sestavení a průběhu vlastní PCR, ale také dobou od naočkování vzorku po získání DNA vhodné pro amplifikaci. Ověřovala jsem proto také použitelnost dříve publikované techniky „párátkové“ PCR (toothpick PCR), umožňující rychlé získání templátové DNA v množství a kvalitě dostatečné pro PCR-fingerprinting z kolonií minimální velikosti, patrných na pevné půdě již cca 12 hod. po naočkování (Steffan et al., 1997).

Pruhy viditelné na gelu odpovídají produktu o délce specifické pro druh *Candida albicans*.



Obr. 27: Toothpick PCR. Do dráhy označené K1 byla vnášena DNA získaná z kolonie označené K1, do dráhy K2 analogicky z kolonie označené K2.

Využitelnost výsledků

Systém primerů pro nested PCR, který jsem optimalizovala v této práci, byl původně publikován Kanbe et al. (2002) s uvedením citlivosti pro *C. albicans* na úrovni 40 fg DNA vnášené do 1. kola nested PCR, pro ostatní druhy bylo pouze uvedeno, že citlivost je „srovnatelná“. V předchozí diplomové práci Mgr. Sehnalíkové se tuto citlivost nepodařilo potvrdit, přesto má systém nespornou výhodu ve vysoké specifitě a širší záběru, proto jsem se snažila jeho citlivost dále zvýšit. Použitím jednozkumavkové nested PCR se toho podařilo dosáhnout při současném snížení rizika křížové kontaminace vzorků. Vzhledem k tomu, že systémem je detekován jednokopiový gen pro topoizomerázu II, pohybuje se dosažená citlivost na hranici detekční schopnosti metody *in vitro*.

Další zvýšení citlivosti je možné dosáhnout detekcí mnohokopiového genu, např. genu kódujícího 5.8S ribozomální RNA a přilehlé ITS oblasti (Bougnoux et al., 1999), u kterého byla ale v předchozí práci Mgr. Sehnalíkové zjištěna nízká specifita. Nabízí se ovšem možnost zvýšení specifity tohoto systému optimalizací teploty nasedání primeru a kompenzace očekávaného snížení citlivosti analogicky prováděním jednozkumavkové nested PCR. Otevřená zůstává otázka přínosu 5'-fosforylace vnitřních primerů, který se nepodařilo jednoznačně potvrdit, i když získané výsledky tuto možnost částečně podporují.

Protože se ale citlivost stanovení i tak pohybuje na hranici teoretického detekčního limitu, může být její další zvyšování bez dalšího přínosu. Lze ale předpokládat, že by použití primerů chráněných fosforylací mohlo zvýšit spolehlivost stanovení – pokud na hranici detekčního limitu reakce s určitou pravděpodobností selhává, může to být dáno nejen faktickou nepřítomností templátové DNA v daném vzorku, ale také selháním reakce z důvodu snížení účinnosti amplifikace při exonukleázovém odštěpování vnitřních primerů. Pokud je kandidová DNA detekována ve sterilních tekutinách (zejména krev, příp. plazma nebo sérum), pak má každé zvýšení citlivosti a spolehlivosti detekce smysl.

V mé práci demonstruji výsledky nested PCR v klasickém termocykleru, protože jsem neměla možnost provádět práci na real-time cykleru v dostatečném rozsahu. Lze

předpokládat, že využití real-time systému by mohlo přinést spolehlivější zhodnocení přínosu 5'-fosforylace pro zvýšení citlivosti a spolehlivosti detekce. Kromě toho lze předpokládat, že použití real-time cyklieru pro nested PCR by dále zvýšilo teoretickou citlivost stanovení, což ale nemusí být prakticky užitečné vzhledem k tomu, že se reakce v optimalizovaném uspořádání pohybuje na hranici dosažitelného limitu detekce.

Použití real-time systému by ovšem mohlo zkrátit dobu potřebnou pro provedení reakce, která není u nested PCR zanedbatelná. Kratší časy pro nasedání primerů by také mohly přinést zvýšení specifity při zachování vysoké citlivosti. V neposlední řadě nabízí real-time PCR možnost vypuštění gelové elektroforézy a její nahrazení hybridizací se sondou nebo určení profilu tání produktu. U nested PCR se dvěma páry primerů a minimálně dvěma, příp. i více částečně homologními produkty by ovšem kombinace těchto dvou přístupů vyžadovala další pravděpodobně zdlouhavou optimalizaci.

Nabízí se i atraktivní možnost současného provádění obou kol nested PCR s chráněnými vnitřními primery současně v jedné zkumavce, která by mohla přinést stejnou citlivost při výrazném snížení rizika falešné positivity, protože pravděpodobnost křížové kontaminace by byla stejná jako u jednokolové PCR.

Předmětem této práce byla pouze optimalizace vlastní PCR amplifikace, ověřovaná na přečištěné templátové DNA. V kontextu použití této metody je ovšem třeba zmínit, že vlastní amplifikace není nejkritičtější krokem detekce kandidové DNA v klinickém vzorku. Nejproblematičtější místem je kvantitativní extrakce DNA patogena z klinického vzorku, který navíc obsahuje inhibitory PCR. Proto je faktická citlivost celého stanovení určovaná v CFU/ml vzorku i o řád nižší než citlivost dosahovaná *in vitro* na přečištěné DNA. Pro posouzení citlivosti samotné PCR amplifikace je ovšem stanovení *in vitro* citlivosti nejpřesnější.

Možnosti další optimalizace metod extrakce DNA z klinického vzorku jsou dnes omezené zejména ekonomickými limity. Jako atraktivní možnost se nabízí „usmíření“ tradiční hemokultivace a PCR detekce, kdy byla popsána vyšší citlivost PCR detekce v případě, že kvasinky byly nejdříve namnoženy v hemokultivační nádobce automatizovaného systému (Maaroufi et al., 2004; Selvarangan et al., 2003).

Tento postup by mohl přinést dvojí výhodu – kultivace vede současně k pomnožení templátové DNA díky množení patogena a k naředění inhibitorů PCR z krevního vzorku. Nezanedbatelný je i ekonomický aspekt, protože PCR detekce by mohla být prováděna jen u pozitivních hemokultivačních nádobek. Postup sice vede k prodloužení celkové doby potřebné k detekci a identifikaci, oproti klasickému uspořádání tuto dobu ale stále výrazně zkracuje a zároveň zachovává možnost další charakterizace vykultivovaného patogena, zejména stanovení citlivosti k antimykotikům a posouzení příp. klonální struktury populace patogenů v konkrétním zdravotnickém zařízení. Nevýhodou tohoto postupu je pravděpodobné snížení citlivosti záchytu, protože různí autoři opakovaně demonstrují vyšší citlivost PCR detekce oproti klasické kultivaci u kvasinkových infekcí (Flahaut et al., 1998; Loeffler et al., 1998; Wahyuningsih, 2000).

Další omezení techniky PCR detekce kvasinkové infekce, zejména kandidémie, spočívá v tom, že DNA patogena se v krevním vzorku nemusí v průběhu infekce vyskytovat nepřetržitě. Jednotlivý negativní výsledek u imunokompromitovaného pacienta s febrilií nejasné etiologie má proto minimální vypovídací schopnost. U pacientů ohrožených kandidémií je proto doporučováno provést postupně několik odběrů, a to po celou dobu, kdy jsou vystaveni vysokému riziku rozvoje invazivní kandidózy. První vyšetření by mělo být uděláno při příjmu pacienta do zdravotnického zařízení ke stanovení základních hodnot a měl by být brán v potaz fakt, že ke stanovení diagnózy u imunokompetentního a imunokompromitovaného pacienta budou potřeba odlišné přístupy. Hodnocení výsledků získaných ze série diagnostických testů, spolu s výsledky kultivačních vyšetření a klinickými příznaky pacienta se ukazují jako nejpřínosnější přístup pro včasnou diagnózu invazivní kandidózy a monitorování odpovědi na antimykotickou léčbu (Pontón et al., 2002).

Závěr

Ukázala jsem, že tradiční způsob zvýšení výtěžnosti a citlivosti PCR na základě optimalizace teploty nasedání primerů, koncentrace hořčíku a množství primeru není vhodný pro systémy určené pro specifickou detekci různých kvasinkových patogenů v klinickém vzorku. Neuspokojivou *in vitro* citlivost detekce pomocí systému vyvinutého Kanbe et al. (2002) se mi naproti tomu podařilo zvýšit netradičním postupem provádění nested PCR v jedné zkumavce bez významné ztráty specifity detekce. Nevyločila jsem možnost, že citlivost a spolehlivost stanovení by bylo možné dále zvýšit použitím vnitřních primerů chráněných na 5'-konci fosforylací. Optimalizovaná technika je použitelná také pro amplifikaci DNA *C. albicans*, získané zjednodušenou extrací z kolonie minimální velikosti tzv. párátkovou metodou. Lze předpokládat, že optimalizovanou techniku bude možné úspěšně použít pro citlivou a specifickou detekci a identifikaci patogenních kvasinek z klinického vzorku i z kultury, včetně směsných kultur, tj. např. z pozitivní hemokultury v kultivační nádobce nebo z kolonie vyrostlé na misce po primokultivaci.

Literatura

- ARIKAN, S., REX, J. H.: New agents for the treatment of systemic fungal infections-current status. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2002, roč. 7, č. 1, s. 3-32. Abstrakt z databáze Medline.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K.: Current protocols in molecular biology, volume 2. John Wiley&Sons, Inc., 1994, s.15.0.3-15.1.8.
- BEDNÁŘ, M., SOUČEK, A., VÁVRA, J.: Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie. Triton, 1994, s. 168-171.
- BUCHMAN, T. G., ROSSIER, M., MERZ, W. G., CHARACHE, P.: Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplifications. Part 1. Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene. *Surgery*, 1990, roč. 108, s. 338-347.
- BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J., HORÁK, V.: Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty. Karolinum, 1998, s. 144, 147, 155.
- CRAMPIN, A. C., MATTHEWS, R. C.: Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment. *J. Med. Microbiol.*, 1993, roč. 39, s. 233-238.
- FELL, J. W., STATZELL-TALLMAN, A., LUTZ, M. J., KURTZMAN, C. P.: Partial rRNA sequences in marine yeasts; a model for identification of marine eukaryotes. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1992, roč. 1, s.175-186. Převzato z Calderone, 2002.
- FLAHAUT, M., SANGIARD, D., MONOD, M., BILLE, J., ROSSIER, M.: Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans* – secreted aspartic proteinase genes. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, roč. 36, 395-401.
- CHEN, F. T., LIU, C. M., HSIEH, Y. Z., STERNBERG, J. C.: Capillary electrophoresis – clinical tool. *Clin. Chem.*, 1991, roč. 37, s. 14-19. JORDAN, J. A.: PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, roč. 32, s. 2962-2967.

- JAROŠOVÁ, M., TAKÁČOVÁ, S., DIVOKÝ, V., VRTĚL R., LUHOVÝ, M., RACLAVSKÝ, V.: Kurz vybraných metod molekulární biologie. Ústav biologie LF UP, 2002, s. 33-34.
- KALE, P., JOHNSON, L. B.: Second-generation azole antifungal agents. *Drugs today*, 2005, roč. 41, č. 2, s. 91-105. Abstrakt z databáze Medline.
- KAN, V. L.: Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J. Infect. Dis.*, 1993, roč. 168, s. 779-783.
- KANBE, T., HORII, T., ARISHIMA, T., OZEKI, M., KIKUCHI, A.: PCR based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast*, 2002, roč. 19, s. 973-989.
- KULLBERG, B. J., FILLER, S. G.: Candidemia. In: Calderone, R. A.: *Candida* and Candidiasis, ASM Press, 2002, s. 327-340.
- LOEFFLER, J., HEBART, H., SEPE, S., SCHUMCHER, U., KLINGEBIEL, T., EINSELE, H.: Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. *Med. Mycol.*, 1998, roč. 36, s. 275-279.
- LOEFFLER, J., DORN, C., HEBART, H., COX, P., MAGGA, S., EINSELE, H.: Development and evaluation of the Nuclisens Basic Kit NASBA for the detection of RNA from *Candida* species frequently resistant to antifungal drugs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2003, roč. 45, s. 217-220.
- MAAROUFI, Y., DE BRUYNE, J. M., DUCHATEAU, V., GEORGALA, A., CROKAERT, F.: Early detection and identification of commonly encountered *Candida* species from simulated blood cultures by using a real-time PCR-based assay. *J. Mol. Diagn.*, 2004, roč. 6, s. 108-114.
- MASTERTON, R., DRUSANO, G., PATERSON, D. L., PARK, G.: Appropriate antimicrobial treatment in nosocomial infections – the clinical challenges. *J. Hosp. Infect.*, 2003, roč. 55, č. 1, s. 1-12.
- PONTÓN, J., MORAGUES, M. D., QUINDÓS, G.: Non-culture-based diagnostics. In: Calderone, R. A.: *Candida* and Candidiasis, ASM Press, 2002, s. 395-425.
- REISS, E., OBAYASHI, T., ORLE, K., YOSHIDA, M., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.: Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med. Mycol.*, 2000, roč. 38, č. 1, s. 147-159.

- RICHARDSON, M. D., CARLSON, P.: Culture and non-culture-based diagnostics for *Candida* species. In: Calderone, R. A.: *Candida* and Candidiasis, ASM Press, 2002, s. 387-394.
- RUHNKE, M.: Skin and mucous membrane infections. In: Calderone, R. A.: *Candida* and Candidiasis, ASM Press, 2002, s. 307-326.
- SELVARANGAN, R., BUI, U., LIMAYE, A. P., COOKSON, B. T.: Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, roč. 41, s. 5660-5664.
- STEFFAN, P., VAZQUEZ, J. A., BOIKOV, D., CHUN XU, SOBEL, J. D., AKINS, R. A.: Identification of *Candida* Species by Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting of Colony Lysates. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, roč. 35, č. 8, s. 2031-2039.
- SULLIVAN, D. J., COLEMAN, D. C.: Molecular approaches to identification and typing of *Candida* species. In: Calderone, R. A.: *Candida* and Candidiasis, ASM Press, 2002, s. 427-441.
- WAHYUNINGSIH, R., FREISLEBEN, H. J., SONNTAG, H. G., SCHNITZLER, P.: Simple and rapid identification of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, roč. 38, s. 3016-3021.
- WIDJOJOATMODJO, M. N., BORST, A., SCHUKKING, R. A. F., BOX, A. T. A., TACKEN, N. M. M., GEMEN, B. V., VERHOEF, J., TOP, B., FLUIT, A.C.: Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) detection of medically important *Candida* species. *J. Microbiol. Methods*, 1999, roč. 38, s. 81-90.
- WILSON, D., JOYCE, M. J., HALL, L. S., RELLER, L. B., ROBERTS, G. D., HALL, G. S., ALEXANDER, B. D., PROCOP, G. W.: Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, roč. 43, s. 2909-2912.
- WILSON, S. M., NAVA, E., MORALES, A., GODFREY, FAUSSETT, P., GILLESPIE, S., ANDERSSON, N.: Simplification of the Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in the tropics. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, roč. 87, s. 177-180.

WITTWER, C. T., RIRIE, K. M., ANDREW, R. V., DAVID, D. A., GUNDRY, R. A., BALIS, U. J.: The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *BioTechniques*, 1997, roč. 22, s. 176-181.

Ostatní zdroje:

<http://biologi.uio.no>

<http://biologie.upol.cz/metody>

www.bio.davidson.edu

www.ivpresearch.org

www.top-bio.cz

Mikro-verze AISLP-ČR 2005.4

Přílohy

Příloha 1 - Seznam obrázků

Obr. 1: Schéma polymerázové řetězové reakce	19
Obr. 2: Schéma nested PCR.....	27
Obr. 3: Real-time PCR, použití interkalačního barviva.	30
Obr. 4: Real-time PCR, příklad použití fluorescenčně značené sondy.....	31
Obr. 5: Velikosti fragmentů DNA markeru 155-970 firmy Top-Bio	48
Obr. 6: Citlivost nested PCR bez použití PCR enhanceru.	50
Obr. 7: Citlivost nested PCR s použitím PCR enhanceru.	50
Obr. 8: Optimalizace teploty nasedání v 1. kole.....	51
Obr. 9: Optimalizace koncentrace hořčíku v reakční směsi pro 1. kolo.....	52
Obr. 10: Optimalizace koncentrace primerů v reakční směsi pro 1. kolo.....	53
Obr. 11: Optimalizace teploty nasedání ve 2. kole	54
Obr. 12: Optimalizace koncentrace hořčíku v reakční směsi ve 2. kole.....	54
Obr. 13: Optimalizace koncentrace primerů v reakční směsi ve 2. kole.....	55
Obr. 14: Citlivost nested PCR po optimalizaci podmínek amplifikace.	56
Obr. 15: Druhovú specifita amplifikační reakce prováděné za optimalizovaných podmínek.....	57
Obr. 16: Nested PCR v jedné zkumavce. Množství vnášené DNA 2 pg.	59
Obr. 17: Nested PCR v jedné zkumavce. Množství vnášené DNA 400 fg.....	60
Obr. 18: Nested PCR v jedné zkumavce. Množství vnášené DNA 40 fg.....	60
Obr. 19: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce za podmínek optimalizovaných tradičním způsobem ke zvýšení citlivosti.....	62
Obr. 20: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce při původních podmínkách, zajišťujících vysokou specifitu.....	62
Obr. 21: Specifita nested PCR v jedné zkumavce za podmínek optimalizovaných pro vysokou citlivost.	64
Obr. 22: Specifita nested PCR v jedné zkumavce za původních podmínek zajišťujících vysokou specifitu.....	64
Obr. 23: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce po 20 cyklech 2. kola za použití nechráněných primerů.	66

Obr. 24: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce po 20 cyklech 2. kola za použití chráněných primerů.....	66
Obr. 25: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce po 30 cyklech 2. kola za použití nechráněných primerů.....	67
Obr. 26: Citlivost detekce nested PCR v jedné zkumavce po 20 cyklech 2. kola za použití chráněných primerů.....	67
Obr. 27: Toothpick PCR.	69

Příloha 2 - Seznam tabulek

Tab. 1: Ředící řada templátové DNA.....	40
Tab. 2: Sekvence vnějších nespecifických a vnitřních specifických primerových párů pro druh <i>Candida albicans</i>	40
Tab. 3: Složení master mixu pro jednu reakci, klasická nested PCR, obě kola, Robocycler Gradient 96.	41
Tab. 4: Složení master mixu pro jednu reakci, nested PCR v jedné zkumavce, obě kola, Robocycler Gradient 96.	42
Tab. 5: Složení master mixu pro jednu reakci, klasická nested PCR, obě kola, Rotor-Gene 3000.	42
Tab. 6: Složení master mixu pro jednu reakci, nested PCR v jedné zkumavce, obě kola, Rotor-Gene 3000.	43
Tab. 7: Parametry nested PCR prováděné na Robocycleru Gradient 96.....	44
Tab. 8: Parametry nested PCR prováděné na Rotorgene 3000	45
Tab. 9: Podmínky amplifikace před a po optimalizaci.....	55