

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav lékařské mikrobiologie

Eliška Machalová

Sérologická a PCR diagnostika systémových mykóz

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Daniel Čodl, Ph.D.

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jen uvedených pramenů a literatury.

V Praze dne 15.4. 2008

podpis

Děkuji Ing. Danieli Codlovi za odborné vedení práce, poskytování cenných rad a materiálových podkladů k práci.

OBSAH

ÚVOD	7	
1	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
1.1	Aspergillus	8
1.1.1	Obecný úvod	8
1.1.2	Charakteristika.....	9
1.1.3	Epidemiologie	13
1.1.4	Klinické jednotky	14
1.1.5	Laboratorní diagnostika	15
1.1.6	Léčba.....	17
1.2	Sérologické metody	18
1.2.1	Detekce beta-glukanu	19
1.2.2	Detekce galaktomannanu	20
1.2.2.1	Latexová aglutinace	20
1.2.2.2	ELISA test	21
1.2.3	Detekce metabolitů	22
1.3	Molekulárně biologické metody	22
1.3.1	Izolace DNA	24
1.3.1.1	Metoda adsorpce na silikát	24
1.3.2	Amplifikační metody	25
1.3.2.1	Polymerázová řetězová reakce	25
1.3.2.2	Uhnížděná PCR	26
1.3.2.3	Kvantitativní PCR v reálném čase	27
2	CÍL PRÁCE	28
3	MATERIÁL A METODY	29
3.1	Izolace DNA z klinických vzorků	29
3.1.1	Metoda izolace z tkáně	29

3.1.2	Metoda izolace ze séra	29
3.2	Kvantitativní PCR v reálném čase.....	30
3.2.1	Amplifikace aspergilové DNA.....	30
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1	Zavedení a optimalizace metody real-time PCR.....	32
4.2	Testování klinických vzorků a porovnání výsledků PCR s detekcí GM metodou ELISA	36
4.2.1	Záchyt aspergilové DNA v klinických vzorcích	36
4.2.2	Porovnání detekce DNA aspergila s ELISA detekcí galaktomannanu.....	38
	ZÁVĚR	41
	LITERATURA A PRAMENY	42
	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	46

ÚVOD

Invazivní mykotické infekce, zvláště u imunokompromitovaných pacientů, způsobují závažné klinické komplikace s poměrně vysokou mortalitou. Nejčastější infekce způsobují mikromycety rodu *Candida* a *Aspergillus*. Zatímco výskyt invazivní kandidózy po zavedení nových (triazolových) mykotických preparátů postupně klesá, u aspergilózy je pozorován vzestup incidence i mortality [1,2,3].

Úspěšná léčba těchto infekcí je úzce spjata s včasnou detekcí houby a se zahájením agresivní cílené terapie. Konvenční diagnostické postupy (histologie a kultivace) však přinášejí průkaz původce pozdě, často až ve stadiu plně rozvinutého onemocnění, a mohou vést k falešně negativním výsledkům. Z těchto důvodů se stále více začínají prosazovat nové přístupy pro rychlou a citlivou detekci mykotických infekcí. V případě invazivní aspergilózy se laboratorní diagnostika spoléhá především na průkaz agens pomocí imunologických testů (detekce antigenu) nebo molekulárně biologických metod (detekce DNA). Velkého rozvoje dosahují molekulárně biologické metody, zejména amplifikační techniky (polymerázová řetězová reakce), které vynikají rychlostí, specificitou a vysokou citlivostí [1,4,5,6,7].

1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Systémové mykózy lze podle způsobu vzniku rozdělit na dvě skupiny, na endemické a oportunní. Endemické mykózy se obvykle vyskytují u zdravých jedinců v endemických oblastech, ale k manifestaci onemocnění dojde jen u relativně malého počtu lidí. Původci oportunních mykóz jsou ubikviterní (rody *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, třída Zygomycetes), často žijí saprofytický jako komenzální flóra, kolonizují většinu lidí, ale klinicky onemocní jen imunologicky oslabení jedinci. Oportunní infekce zvyšují morbiditu a mortalitu, komplikují léčebné postupy, jsou příčinou prodloužení hospitalizace a zvýšení výdajů na léčbu. Značná pozornost je jim věnována od 60. a začátku 70. let minulého století. S rozvojem invazivních diagnosticko-terapeutických postupů riziko vzniku těchto infekcí narůstá [1,8, 9,10].

1.1 Aspergillus

1.1.1 Obecný úvod

Aspergilózu způsobují vláknité mikromycety rodu *Aspergillus*, dominuje *A. fumigatus* (více jak 80 % případů), dále *A. flavus* a *A. niger*. Vzniklé onemocnění není druhově kontagiózní, kromě postižení člověka se aspergilóza vyskytuje u celé řady druhů zvířat [11,12].

Aspergillus (česky kropidlák) byl poprvé popsán v roce 1729 italským knězem a biologem P. A. Michelim, kterému průřez rozmnožovacím orgánem houby pod mikroskopem připomínal kropenku, latinsky aspergillum. První popsání případu infekce bylo pozorováno v roce 1815 u kavky obecné (*Corvus monedula*). První lidský případ byl popsán roku 1842 v Edinburghu. Aspergilovou infekci u člověka pozoroval roku 1847 Sluyter a nazval ji „pneumocystis“, označení aspergilóza pochází od Fresenia, a to až z roku 1850. V roce 1887 zmiňuje Popoff alergické onemocnění plic, jednalo se především o profesní nákazy, např. pracovníků v zemědělství nebo parukářů [8,12,13,14].

Zástupci rodu *Aspergillus* jsou ubikviterní saprofytické mikroorganismy, šíří se pomocí spor (konidií), které jsou unášeny vzduchem. Jejich přirozeným prostředím je půda, hojně se také vyskytují ve vlhkém prostředí, v rozkládajících se biologických materiálech, listí a

kompostech. Jedná se o houby s celosvětovým rozšířením, které zastávají důležitou roli v koloběhu dusíku a uhlíku [12,15,16,17].

1.1.2 Charakteristika

Taxonomie

Houby jsou extrémně variabilní mikroorganismy, což značně ztěžuje jejich klasifikaci a v případě patogenních druhů i diagnostiku. Carl Linné, když se pokoušel houby taxonomicky zařadit, napsal: „Fungorum ordo chaos est – řád hub je chaotický“ [12].

Rod *Aspergillus* v současnosti obsahuje více než 182 druhů. Základní taxonomické schéma rodu *Aspergillus* je uvedeno v tabulce 1.

Říše	Fungi
Třída	Ascomycota
Řád	Eurotiales
Rod	Trichocomaceae
Druh	<i>Aspergillus</i>

Tab. č. 1: Základní taxonomické schéma rodu *Aspergillus* [12]

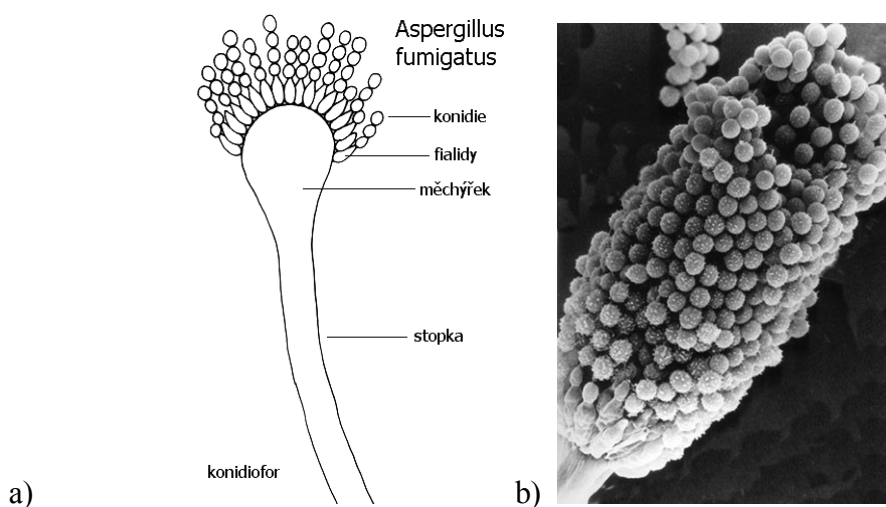
Morfologie

Aspergillus spp. se řadí mezi vláknité houby. Vlákná (hyfy) jsou dělena septy, mají 3-10 μm v průměru a dichotomicky (45° , tvar písmene Y) se větví. Makroskopický útvar složený z rozvětvených hyf se nazývá mycelium. Podle lokalizace a funkce má dvě části. Mycelium vegetativní (bazální) vrůstá do kultivační půdy a čerpá živiny. Vzdušné mycelium (povrchové, reprodukční) nese reprodukční orgány. Konce vláken jsou rozšířeny v konidiofor, který nese volné, řetízkovitě uspořádané malé konidie. Velikost konidií je 2.5-3 μm , mají většinou šedozelenou barvu, způsobenou akumulací 1,8-dihydroxynaftalen(DHN)-melaninu. Některé kmeny aspergilů produkují bílé konidie [12,15,16,18,19].

Jedná se o termofilní druhy, schopné růst při teplotách dosahujících 55 °C, přežívají do 70 °C. Schopnost růstu na kultivačních půdách při 37 °C odlišuje *Aspergillus* spp od ostatních nepatogenních plísní [11,15,16,18,20,21].

Kolonie vláknitých mikromycet, které rostou specifickým způsobem na diagnostických živných půdách, jsou hodnoceny podle svých makromorfologických znaků (struktura kolonie, její velikost, zbarvení kolonie, vztah k pevné půdě). V připraveném mikroskopickém preparátu pak jsou dále hodnoceny podle mikromorfologických znaků (způsob větvení mycelia, tvar vláken, přítomnost sept, tvar a velikost nepohlavních rozmnožovacích orgánů, spór) s využitím určovacích klíčů. Povrchovou ornamentací spór, jako identifikační údaj, je možné hodnotit s využitím elektronového mikroskopu [9,12,20].

Základním kultivačním médiem pro patogenní houby je Sabouraudův glukózový agar (SGA), který existuje v několika modifikacích. Charakter růstu a vzhled kolonií aspergilů se nejčastěji studuje na Czapek-Doxově bramborovém (Potato dextrose) a sladinkovém (Malt) agaru [12].



Obr. č. 1: a) Nákres konidioforu *A. fumigatus* [22]

b) Konidiofor *A. fumigatus*; snímek pořízený rastrovacím elektronovým mikroskopem [23]

Struktura buněčné stěny

Stěna mycelia má funkci jako bariéra permeability, dovoluje uvolnění hydroláz a tím usnadňuje pronikání do plicního parenchymu. Hlavní strukturální složkou stěny *A. fumigatus* jsou polysacharidy, a to rozpustné v zásadách, složené hlavně z glukánů a méně

z galaktomannanu, a frakce v zásadách nerozpustná, která je zodpovědná za rigiditu stěny. Základní složkou je α -(1,3)-glukan, β -(1,3)-glukan, některé z nich s β -(1,6) větvením, lineární β -(1,3), β -(1,4)-glukan, chitin a galaktomannan [18,24].

Stěna konidií má hydrofobní vlastnosti, je složena z husté pigmentované zevní vrstvy a průsvitné vnitřní vrstvy. Konidiová stěna *A. fumigatus* obsahuje melaninovou složku, která má význam v ochraně proti fagocytóze. Bílé konidie bývají mnohem více poškozené fagocytózou než zelené [19,24].

Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity vláknitých mikromycet. Představují strukturálně odlišné komplexní organické sloučeniny o nízké molekulové hmotnosti (až na výjimky nižší než 700 g/mol), toxické pro člověka a živé organizmy. Důvod, proč jsou mykotoxiny produkovány, je vysvětlován tím, že jsou prostředkem vláknitých mikromycet v boji o potravu a přežití. Mykotoxiny nejsou nezbytné při rozvoji vláknitých mikromycet ve srovnání s aminokyselinami, mastnými a nukleovými kyselinami nebo proteiny (proto název sekundární metabolity) [12].

Gliotoxin je hlavní známý toxin produkováný *A. fumigatus*. Z hlediska chemické struktury se řadí mezi cyklické dipeptidy. Gliotoxin vykazuje imunosupresivní účinky vůči lidským leukocytům, blokuje fagocytózu a transkripci mediátorů zánětu, indukuje apoptózu neutrofilů a monocytů. *In vitro* byly pozorovány ciliostatické účinky gliotoxinu na buňky respiračního epitelu [12,18,24].

Struktura genomu

Nedávné sekvenování genomu *Aspergillus fumigatus* (Af293) odhalilo, že se skládá z osmi chromozomů, které obsahují přibližně 9926 genů. Velikost genomu činí 29.4 Mb. Další vlastnosti jaderného genomu *A. fumigatus* jsou uvedené v tabulce 2. Sekvenování probíhalo v rámci mezinárodní spolupráce vědců z britského Wellcome Trust Sanger Institutu (WTSI, <http://www.sanger.ac.uk>) a z Venterova Ústavu pro výzkum genomů (TIGR, <http://www.tigr.org>) [14,25].

Vlastnosti genomu	Hodnota
Počet chromozomů	8
Velikost (Mb)	29,4
Obsah bází GC (%)	49,9
Počet genů	9 926
Průměrná délka genu (bp)	1 431

Tab. č. 2: Charakteristika jaderného genomu *Aspergillus fumigatus* (Af293) [25]

Patogenita a virulence

V současnosti bylo popsáno asi 18 druhů aspergilů patogenních pro člověka. Ve skutečnosti však za více jak 95 % všech aspergilových infekcí odpovídají pouze tři druhy *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, a *A. niger*, z nichž *A. fumigatus* výrazně dominuje v etiologii aspergilózy více než 80 % podílem. Z dalších druhů jsou pravidelně popisovány infekce vyvolané *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. ustus*, *A. versicolor*, vzácně se můžeme setkat s *A. alliaceus*, *A. hollandicus*, *A. avenaceus*, *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. chevalieri*, *A. clavatus*, *A. conicus*, *A. flavipes*, *A. glaucus*, *A. granulosis*, *A. janus*, *A. japonicus*, *A. restrictus*, *A. sclerotiorum*, *A. sydowii*, *A. tetrazonus*, *A. unguis* [12,16,18].

Vedle infekčních onemocnění se rod *Aspergillus* významně podílí rovněž na mykoalergiích (alergická bronchopulmonální aspergilóza), opět převážně *A. fumigatus*, méně často *A. flavus* a *A. niger* [12,16].

Samostatný problém představují toxikogenní druhy aspergilů, které kontaminují mykotoxiny své okolí a podílejí se na vzniku a rozvoji mykotoxikóz [12].

Patogenita a virulence některých druhů rodu *Aspergillus* je multifaktoriální tj. dána řadou faktorů. Jedním z nich je pravděpodobně produkce enzymů, zvláště extracelulárních proteáz (elastáza), které byly v poslední době charakterizovány metodami biochemickými a molekulárně biologickými. Za důležitý faktor virulence je považována produkce toxinů (fumitremorgeny, verukulogen, gliotoxin) proliferující houbou do tkáně, která usnadňuje růst v plicích. Dalším faktorem, který přichází v úvahu, je syntéza pigmentu melaninu. Melanin

poskytuje ochrannou bariéru proti UV záření a slouží tak k zachování integrity genomu dlouhožijících buněk (spór). Jiné protektivní mechanismy melaninu spočívají ve snižování účinnosti fagocytózy a vnitrobuněčného transportu konidií do acidifikačních kompartmentů monocytů, zvyšování odolnosti vůči reaktivním kyslíkovým radikálům a lýze buňky. Adherence konidií k hostitelovým proteinům (fibrinogen, laminin, fibronectin, kolagen) představuje další důležitý krok v patogenezi infekce. O adherenci rodu *Aspergillus* existuje jen málo studií [12,18,19,24].

1.1.3 Epidemiologie

Podle různých literárních údajů způsobují v současné době mikroskopické houby 4-12% všech nozokomiálních infekcí. Nejčastějšími agens mykotických onemocnění jsou kandidy (60-80% *Candida albicans*, 20-30% *Candida non-albicans*), aspergily (15-30%), kryptokoky (2%) a sporadicky zygomycota. V posledních letech začíná narůstat incidence kandidóz, které jsou vyvolány kandidami non-albicans, zejména *C.krusei* a *C.glabrata*. *C.albicans*, a v menší míře i většina non-albicans druhů, je součástí přirozené flóry člověka, a proto je většina kandidovaných onemocnění endogenního původu, i když se tyto kvasinky mohou šířit interhumánním kontaktem [1,7,12,26,27].

Aspergilóza je druhou nejvýznamnější oportunní mykotickou infekcí. Jedná se převážně o exogenní nozokomiální infekce. Nejčastější cesta přenosu je vzduchem, pacient se infikuje inhalací konidií. Vzhledem k ubikviternosti těchto plísňových spór v přírodě je možný častý výskyt v dýchacích cestách bez vzniku onemocnění. Bylo zjištěno, že každý člověk vdechne přinejmenším několik set aspergilových konidií denně. Další, vzácnější exogenní cesta přenosu infekce je kontaktem, jako zdroj slouží lékařské nástroje, obvazový materiál apod. Frekvence výskytu invazivní aspergilózy významně stoupá a je spojena s narůstající populací imunoalterovaných pacientů [8,15,17,18,21,27].

Aspergily vykazují jisté vlastnosti, které při poruše obranných mechanismů člověka usnadňují infekci. Bohatá sporulace, schopnost přežívání v širokém rozpětí teplot, malý aerodynamický rozměr spór umožňují po vdechnutí snadný průnik do plicních alveolů [24,27].

Rizikovými skupinami jsou především pacienti s hematologickým onemocněním, pacienti po transplantaci kostní dřeně (zvl. alogenní) nebo solidních orgánů (játra, plíce), hospitalizovaní na JIP, pacienti se závažným vrozeným nebo získaným imunodeficitem [27].

Predisponujícími faktory pro rozvoj IA jsou zejména dlouhodobé podávání imunosupresiv, neutropenie, léčba kortikosteroidy, chemoterapie, radioterapie, invazivní diagnostické a léčebné zákroky, reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), infekce CMV. Významným rizikovým faktorem je kontaminace vzduchu vyšším počtem spór (ventilace, stavební a rekonstrukční práce), zdrojem může být kontaminovaná voda [1,8,12,17,27].

1.1.4 Klinické jednotky

Aspergilové infekce představují širokou skupinu onemocnění s různorodými projevy. Predilekční lokalizací aspergilózy jsou plíce, které jsou postiženy až v 90%. Mimoplicní lokalizace je vzácnější a patří k ní aspergilóza paranazálních dutin, aspergilóza mozku a diseminovaná aspergilóza s klinickou manifestací na gastrointestinálním traktu, játrech, ledvinách, endokardu, kůži apod. [1,8,27,28].

Mezi základní formy postižení respiračního systému jsou řazeny alergická plicní aspergilóza, aspergilom a invazivní (systémová) aspergilóza (IA) [15,27].

Alergická plicní aspergilóza

Podkladem alergické plicní aspergilózy je hypersenzitivní reakce I. a III. typu na aspergilové antigeny při kolonizaci dýchacích cest aspergily a sdružuje několik klinických jednotek. Jsou to alergická bronchopulmonální aspergilóza (ABPA), alergická alveolitida a astma. ABPA je v současnosti nejzávažnějším plicním onemocněním alergické povahy vyvolaným aspergily. Vyskytuje se u pacientů trpících atopickým astmatem a cystickou fibrózou. U neléčených pacientů způsobuje fibrotizaci plicní tkáně, může vyústit v respirační selhání [15,27,28].

Aspergilom

Plicní aspergilom neboli mycetom je projevem saprofytické kolonizace preformovaných plicních dutin komunikujících alespoň zpočátku s bronchiálním stromem. Ty vznikají většinou po prodělané plicní tuberkulóze, z rozpadlého tumoru, při invazivní plicní aspergilóze, sarkoidóze nebo v bronchiektaziích např. u chronické obstrukční plicní choroby. Kolem dutiny je patrná zánětlivá reakce, ale plíseň do okolní tkáně neinvaduje, ani nedochází k diseminaci infekce. Rentgenologický nález ukáže typický obraz vzdušné dutiny s mobilním okrouhlým útvarům uvnitř. Přestože nemocný s mycetomem nemusí mít vůbec žádné obtíže nebo má projevy alergické formy aspergilózy, jeho nebezpečí spočívá v masivní hemoptýze. Tento stav pak vyžaduje urgentní chirurgický zákrok [1,15,27,28].

Invazivní plicní aspergilóza

Nejčastější formou s nejméně závažnými klinickými projevy je u imunokompromitovaných pacientů invazivní plicní aspergilóza. Dominantním etiologickým agens je *A. fumigatus*, podle recentních údajů následovaný *A. terreus*. Základním onemocněním je v naprosté převaze akutní hemoblastóza s neutropenií nebo maligní lymfom. Infekce obvykle začíná endobronchiální proliferací plísně a následně dochází k tkáňové invazi s poškozením plicních cév, s krvácením nebo ischemickou nekrózou parenchymu (plicní infarkty) a rozpadem tkáně. Tato forma invazivní aspergilové infekce se nazývá akutní nekrotizující pneumonitida. Navzdory veškeré lékařské péči a antimykotické terapii přesahuje mortalita u akutních forem IA 80% [8,27,28].

1.1.5 Laboratorní diagnostika

Diagnostika oportunních mykotických infekcí je obtížná, neboť nemají většinou specifické klinické projevy, které jsou u imunoalterovaných nemocných často významně modifikovány. V případě invazivní aspergilózy je zlatým standardem histologický a kulturační průkaz aspergilových vláken ze sterilních tkání získaných biopsií. V poslední době se osvědčují nekulturační diagnostické postupy založené především na imunochemické detekci aspergilového antigenu v séru a na průkazu nukleové kyseliny v krvi nebo jiných

tělních tekutinách, získaných většinou z respiračního traktu. Přínosné v diagnostice i pro včasné zahájení terapie je paralelní monitorování sérologických a molekulárně genetických markerů [1,5,6,16,27,29,30,31].

Ve snaze posílit jistotu při stanovení diagnózy IA navrhla Evropská kooperativní skupina invazivních mykóz (EORTC IFICG) a americká MSG (Mycosis study group) diskriminační bodový systém, v němž výsledné skóre je součtem bodů, stanovených na základě přítomnosti rizikových faktorů, klinických projevů, mikrobiologických, histopatologických a radiologických kritérií, svědčících pro aspergilovou infekci. IA se podle těchto kritérií klasifikuje do tří skupin: 1. jistá, 2. pravděpodobná, 3. možná diagnóza. Každé skupině je přiřazen léčebný přístup ad 1. cílená léčba, ad 2. preemptivní a ad 3. empirická léčba [1,2,3,8,32,33].

Z diagnostického hlediska u invazivní aspergilózy má nejvyšší váhu morfologický průkaz aspergilového mycelia v tkáni, který je bohužel často prokázán až při velkém a nevratném poškození vnitřních orgánů popř. *post mortem*. Mikroskopické vyšetření obvykle umožní pouze orientační popis zachyceného agens, problémem je podobný vzhled mycelia některých dalších rodů vláknitých hub (*Penicillium*, *Fusarium*, *Scedosporium* spp). Navíc k získání vzorků slouží invazivní procedury, jejichž indikaci je nutno u některých rizikových pacientů (trombocytopenie, koagulopatie) pečlivě zvážit. Další kritérium představuje pozitivní kulturační nález materiálu odebraného z míst, která jsou obvykle sterilní (tracheální aspirát, výplach bronchoalveolární laváže, plicní biopsie). Během kultivace lze stanovit citlivost k antimykotikům. Hlavní nevýhoda kultivace spočívá v tom, že je časově náročná a poměrně málo citlivá. Hodnocení výsledků kultivací z mnohých materiálů může být ztíženo tím, že je obtížné odlišit invazivní infekci od kolonizace. Přínosné v diagnostice IA je stanovení antigenémie (galaktomannan) metodou ELISA, které při senzitivitě a specificitě přesahující 90 % dobře koreluje s klinickým vývojem onemocnění a podporuje definici pravděpodobné mykózy. Předností sérologické detekce je také rychlost získání výsledků a vysoká rodová specificita. Molekulárněbiologické metody, jako např. průkaz specifických sekvencí nukleových kyselin, nejsou v diagnostice IA rutinně využívány. Výsledky PCR metod nejsou zahrnuty mezi současná kritéria navržená EORTC-MSG pro definici invazivních mykotických infekcí [3,29,30,31,32,33,34,35,36].

1.1.6 Léčba

Léčba oportunních mykotických infekcí je problematická, zejména vzhledem k omezenému počtu účinných antimykotických léků.¹ V porovnání s antibakteriálními látkami je počet antimykotik výrazně nižší a jejich účinnost je variabilní v závislosti na povaze patogenu, lokalizaci infekce a stavu imunity pacienta [3,12].

Mezi antimykotika vhodná k léčbě invazivní aspergilózy patří:

a) Polyeny

Lékem volby při terapii IA je už od roku 1960 amfotericin B (AmB). Mechanismus účinku spočívá ve vazbě na ergosterol v membráně mikroskopických hub, dochází tím k rozrušení kontinuity membrány, ke vzniku pórů, úniku iontů a vylití buněčného obsahu. Určité omezení konvenčního AmB spočívá v limitu dávky a nefrotoxicitě, která je u lipidových forem nižší. Druhy *A. terreus*, *A. nidulans* bývají vůči AmB rezistentní [2,9].

b) Triazoly

K preparátům první volby se řadí vorikonazol. Mechanismus účinku spočívá v inhibici mykotické 14 α -sterol-demethylace zprostředkované cytochromem P450, která představuje základní krok v biosyntéze ergosterolu, důležité membránové komponenty. Vorikonazol je biotransformován hepatocyty, proto u těžších jaterních lézí je nutné redukovat jeho dávku. K lékům druhé linie patří itrakonazol. Itrakonazol, jako ostatní triazolová antimykotika, narušuje v buňkách mikromycet syntézu ergosterolu. Jeho nevýhodou jsou četné, velmi závažné lékové interakce, např. s cyklosporinem A, vinkristinem, statiny. Některé kmeny *A. fumigatus* jsou vůči itrakonazolu rezistentní, za jednu z možných příčin se pokládá rozsáhlé využívání triazolů v zemědělství [2,3,9,15,20].

c) Echinokandiny

Jde o novou skupinu antimykotik se zásahem do stěny hub. Podstatou účinku je inhibice syntézy β -(1,3)-D-glukanu, která způsobí poruchu integrity buněčné stěny. Mezi

¹ Jednu z hlavních překážek ve vývoji nových antifungálních látek s nízkou selektivní toxicitou pro člověka představuje nedostatek odlišných struktur mezi savčí a houbovou buňkou [12].

echinokandinové preparáty používané při léčbě IA patří kaspofungin, micafungin a anidulafungin [2,9,27].

Významný terapeutický problém představuje včasný laboratorní průkaz houby, který je nezbytným předpokladem pro zahájení cílené léčby. Systémová antimykotika se proto podávají převážně preemptivně (pravděpodobná diagnóza) a u těžce imunosuprimovaných nemocných často i empiricky (možná diagnóza) a profylakticky. Preemptivní léčba systémových mykóz se zakládá na monitoringu rizikových pacientů (antigenémie, PCR) a včasném nasazení terapie podle získaných výsledků, ještě před objevením se klinických symptomů. Cílem empirické léčby invazivních mykóz je terapeutický zásah ve včasném stádiu infekce, kdy ještě důkaz patogenu není k dispozici. Antimykotická profylaxe je vhodná u alogenní transplantace kostní dřeně, jater a plic; u pacientů s počtem CD4 lymfocytů nižším než $200/\text{mm}^3$; a během indukční léčby akutní leukemie [3,9,27].

Nová antimykotika významně zlepšila výsledky léčby invazivních mykóz, a to i z hlediska přežití. Procento neúspěchu však zůstává stále relativně vysoké, proto současný stav je možné považovat jen za dílčí úspěch [2].

1.2 Sérologické metody

Sérologický průkaz aspergilózy naráží na několik technických a interpretačních problémů. Detekce protilátkové (IgM, IgG) odezvy má praktickou diagnostickou hodnotu zejména u imunokompetentních pacientů s alergickou bronchopulmonální aspergilózou a aspergilomem. K detekci specifických protilátek slouží řada metod – imunodifúze, protisměrná imuno elektroforéza, komplementfixační metoda, hemaglutinace na částicích, nepřímá imuno fluorescence, radioimunoanalýza a ELISA. Specificita a citlivost reakce záleží na použitém antigenu. Ke zvýšení specificity přispívá používání rekombinantních antigenů [1,9,24].

V případě imunoalterovaných pacientů s IA přítomnost protilátek nekoreluje s patogenním procesem, popř. jsou protilátky již přítomny před rozvojem aspergilózy. V lepším případě lze přítomnost protilátek dávat do souvislosti s příznivou prognózou, ale ne s diagnózou. U této skupiny pacientů se mnohem lépe osvědčily testy pro detekci cirkulujících mykotických antigenů, které jsou součástí buněčné stěny aspergilů. V současnosti jsou k

dispozici metody pro detekci galaktomannanu a β -(1,3)-D-glukanu. Spolehlivost těchto testů je ovlivněna výběrem metody, klinického materiálu a vyžaduje pravidelné monitorování pacienta, tj. sledování dynamického titru antigenu. Nejspokojivější výsledky byly dosaženy metodou ELISA pro detekci galaktomannanu v séru, která je dostatečně citlivá (detekční limit viz Tab. 3), reprodukovatelná, umožňuje detekci galaktomannanu v časných fázích IA, obvykle již před rozvojem symptomatologie onemocnění a koresponduje dobře s klinickým průběhem infekce [7,9,34,37].

Detekce solubilního aspergilového antigenu je hlavní sérologickou metodou pro zlepšení časně a specifické diagnózy aspergilových infekcí. Metoda a její výsledky patří do kritérií pro definici a klasifikaci invazivní aspergilózy [9,32,35].

1.2.1 Detekce beta-glukanu

K detekci 1,3- β -D-glukanu (dále jen beta-glukan) slouží nejčastěji kolorimetrický test Fungitell (Associates of Cape Cod). Tento polysacharid je součástí buněčné stěny celé řady kvasinek a vláknitých hub, jeho detekce umožňuje diagnostiku několika typů invazivních mykóz, není vhodný pro diagnózu zygomycóz a kryptokokových infekcí. Pro správné stanovení diagnózy invazivní aspergilózy je důležité vědět, že beta-glukan je kromě *Aspergillus* spp přítomný u dalších druhů hub (např. *Candida* spp, *Fusarium* spp, *Acremonium* spp) [9,20,29,30,38].

Společným principem všech glukanových esejí je schopnost beta-glukanu aktivovat koagulační kaskádu prostřednictvím faktoru G (serinová proteáza) v amébytech získaných z hemolymfy ostrorepa *Limulus polyphemus*. Typickým vzorkem je krevní sérum. Citlivost beta-glukanových esejí snižují inhibitory serinových proteáz přítomné v plazmě pacientů, které musí být odstraněny během preanalytické fáze. Lidské sérum dále obsahuje nespecifické aktivátory serinových proteáz, jejich odstranění během preanalytické fáze zvyšuje specifitu metody. Byly zaznamenány falešně pozitivní výsledky v souvislosti s hemodialýzou, imunoglobulinovou terapií a kontaktem s gázou obsahující glukan (např. po rozsáhlém chirurgickém zákroku). Negativní vliv na specifitu může mít kontaminace vzorků z okolního prostředí [20,29,30,38].

Detekce positivity beta-glukanu předchází konvenční diagnostické postupy a přispívá k včasnému zahájení antimykotické léčby. Dá se využít pro sledování léčebné odpovědi na

antimykotika. Test je vysoce citlivý, jeho nevýhodou je technicky náročné provedení a také poměrně vysoká cena. Zatím se v ČR tato metoda v rutinním testování nepoužívá [9].

1.2.2 Detekce galaktomannanu

Galaktomannan (GM) je termostabilní heteropolysacharid, přítomný v buněčné stěně většiny hub rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Jádrem molekuly tvoří mannan s různě dlouhými postranními řetězci, které obsahují antigenní determinanty. Struktura molekuly galaktomannanu je pro jednotlivé druhy a kmeny mikromycet specifická, velikost činí 25-75 kDa. Metody používané pro detekci GM ukazuje následující tabulka [20,39,40].

Metoda	Výrobce	Detekční limit
Latexová aglutinace	Pastorex <i>Aspergillus</i> , Biorad	15 ng/mL
RIA	Není k dispozici komerční metoda	10 ng/mL
Sendvičová ELISA	Platelia <i>Aspergillus</i> , Biorad	0,5 – 1 ng/mL

Tab. č. 3: Detekční limit jednotlivých metod pro diagnostiku galaktomannanu v séru [16]

1.2.2.1 Latexová aglutinace

K detekci galaktomannanu pomocí latexové aglutinace se nejčastěji používá test Pastorex *Aspergillus* (Bio-Rad), který umožňuje kvalitativní popř. semikvantitativní stanovení antigenu v séru. Test používá latexové částice pokryté monoklonální protilátkou EB-A2. Latexové částice reagují s polysacharidovým antigenem aglutinací viditelnou pouhým okem. Mez citlivosti testu je 15 ng/ml. Před vlastní reakcí latexové aglutinace je nutná tepelná úprava séra při 100 °C s následnou centrifugací. Tento krok je nutný k disociaci cirkulujících imunokomplexů a eliminaci nespecifických reakcí [1,9].

Latexová aglutinace má řadu výhod – především snadné provedení a rychlost, je ale méně citlivá než průkaz antigenu testem ELISA (viz Tab. 3). Metoda ELISA dává pozitivní výsledky dříve v průběhu infekce při srovnání obou testů [1,9,24,41].

1.2.2.2 ELISA test

Větší význam v časně diagnóze invazivní aspergilózy má detekce galaktomannanu imunoenzymatickými technikami. Princip metody tkví opět v použití krysí monoklonální protilátky (EB-A2), která je namířena proti galaktofuranosylovým zbytkům na postranních řetězcích molekuly galaktomannanu. Pro úspěšné navázání protilátky je nezbytná přítomnost čtyř nebo více epitopů. Detekce se provádí sendvičovou ELISA metodou Platelia Aspergillus (Bio-Rad) [20,40].

V Evropě se rutinní diagnostika tímto způsobem provádí již přes deset let a umožňuje semikvantitativní stanovení cirkulujícího polysacharidového antigenu v biologickém materiálu. Výsledky se vyjadřují číselnou hodnotou jako index positivity (IP), který se rovná poměru optické denzity (OD) vzorku a optické denzity kontrolního séra. Optická denzita se měří spektrofotometrem. Jako pozitivní se označuje vzorek s $IP \geq 0,5$ a jako pozitivní pacient pak nemocný s více než dvěma po sobě jdoucími pozitivními odběry [9,16,30,40].

Platelia Aspergillus test má vysokou specificitu pohybující se od 81% do 100%. Extrémně vysoká je také negativní prediktivní hodnota testu. Negativní výsledek tedy s vysokou pravděpodobností vylučuje invazivní aspergilózu a falešné negativy jsou vzácné. Senzitivita testu je udávána od 30% do 100%. Nejčastěji vyšetřovaným materiálem je sérum, dobré výsledky dává rovněž testování vzorků BAL a mozkomíšního moku. Pozitivita detekce GM metodou ELISA předchází o řadu dní pozitivitu zobrazovacích a kultivačních metod, a zrychlí definitivní stanovení diagnózy. Vývoj hodnoty pozitivního indexu může sloužit k posouzení léčebné odpovědi. Metoda má bohužel některá úskalí, která mohou negativně ovlivnit její senzitivitu a specificitu [9,30,37,40,42].

Senzitivita metody:

- Existují značné rozdíly v senzitivě metody v závislosti na studované populaci nemocných [30,37,40,41,43].
- Důležitým faktorem je hodnota zvoleného cut-off indexu positivity [29,30,37,40,41,42].

- Četné důkazy nasvědčují tomu, že antimykotická léčba, předcházející odběru vzorků na vyšetření, snižuje citlivost galaktomannové metody [20,29,30,40].
- Doporučuje se u vysoce rizikových pacientů monitorovat antigen GM dvakrát až třikrát týdně [37,40,41].
- Aby se diagnostická protilátka mohla navázat, musí molekula GM obsahovat alespoň čtyři antigenní determinanty [20].
- V preanalytické fázi metody se používá kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA). Cílem tohoto kroku je odstranit komplexotvorné protilátky, které by mohly zabránit navázání EB-A2. Antigenní determinanty mohou být kyselinou EDTA degradovány [20].

Specifická metoda:

- Galaktomannan byl prokázán v celé řadě potravin a nápojů. Při interpretaci antigenémie u novorozenců, malých dětí a pacientů s alterovanou střevní stěnou je nutné brát v úvahu dietní faktor. Další exogenní zdroj galaktomannanu představují některá penicilinová antibiotika [29,30,37,40,42,43].
- Byla popsána zkřížená reaktivita s polysacharidovými antigeny plísní patřících k rodům *Penicillium*, *Cryptococcus*, *Paecilomyces*, *Alternaria*, *Rhodotula* a některými bakteriemi [9,30,37,42,43].

1.2.3 Detekce metabolitů

Alternativou k detekci protilátek nebo antigenu je stanovení houbového metabolitu, který je houbou sekretován v průběhu infekčního procesu a je pro daný druh specifický. *Aspergillus* spp produkuje řadu enzymů (metaloproteázy, fosfolipázy), primárních (manitol) a sekundárních metabolitů (tzv. mykotoxiny – gliotoxin), které by se mohly uplatnit jako diagnostické markery invazivní aspergilózy. Tento přístup nemá zatím v klinických

laboratořích využití, protože k měření jsou využívány náročné a složité techniky na principu vysokotlaké kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Je proto obtížné obstarat příslušné přístrojové vybavení a vyškolený personál. Detekce metabolitů v souvislosti s využitím v diagnostice IA je dosud málo probádanou oblastí [12,20,24,29,43].

1.3 Molekulárně biologické metody

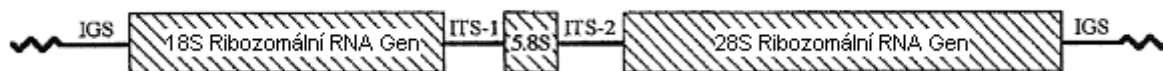
Molekulárně genetické metody představují v lékařské mykologii perspektivní diagnostický přístup. Jejich prostřednictvím lze detekovat houbovou nukleovou kyselinu v klinických vzorcích, provádět druhovou identifikaci mikromycet nebo zjišťovat odlišnosti kmenů uvnitř druhů, případně genetické zvláštnosti, jako je výskyt genů pro rezistenci k antimykotikům, schopnost produkce určitých faktorů virulence atd., které mají význam pro epidemiologické účely. Detekce nukleových kyselin doplňuje tradiční metody průkazu houbových organizmů, tj. mikroskopické, kultivační a sérologické vyšetření. Její zavádění do laboratorní praxe přispívá k celkovému zkvalitnění diagnostiky, zejména ve smyslu rychlého objasnění etiologie infekce a možnosti zahájení cílené antimykotické léčby. Molekulárně genetické techniky stále prodělávají poměrně intenzivní vývoj, proto většinou nejsou dosud k dispozici obecně akceptovatelné a standardizované postupy² [31,33,34,35,36].

Pro zjišťování přítomnosti genetického materiálu houbového agens v klinickém vzorku je využívána především DNA. Technicky se jedná o metody, které vyhledávají sekvence přítomné v genomu ve velkém počtu kopií, čímž se zvyšuje senzitivita vyšetření. Nejčastěji jde o sekvence odvozené z 18S nebo 28S podjednotek genu pro rRNA (viz Obr. 2). Metody lze orientačně rozdělit na postupy, které detekují a specifikují houbovou DNA přímou hybridizací se sondou a na postupy, které před vlastním průkazem a identifikací původce zvyšují kvantitu nukleové kyseliny amplifikací. Obecně jsou pro klinické vzorky vhodnější amplifikační metody, především různé modifikace polymerázové řetězové reakce (PCR) [10,36,44,45].

Výhodami molekulárně genetických metod jsou jejich vysoká citlivost, specificita a rychlost získání výsledků. Úspěšná detekce mykotických patogenů pomocí PCR závisí na výběru vhodného klinického materiálu, izolaci DNA a výběru vhodné PCR metody.

² V současné době je již k dispozici první komerční kit pro detekci *Aspergillus* spp. – affigene Aspergillus Tracer firmy CEPHEID AB (Švédsko).

Problémem metod PCR u aspergilózy může být interpretace výsledků, zvláště při detekci aspergilů v BAL, při kterém se může vyskytovat vyšší procento falešně pozitivních výsledků. To souvisí se zvýšenou kolonizací respiračního traktu rizikových pacientů. Z tohoto hlediska se ukazuje krev resp. sérum jako materiál poskytující spolehlivější informace o případném patogenním působení aspergila [5,9,28,29,30,31,34,44,46].



Obr.č. 2:Schéma uspořádání podjednotek rDNA a ITS oblastí v genomu *A. fumigatus*. S, Svedbergova jednotka; ITS, vnitřní přepisované mezerníky; IGS, nepřepisované mezigenové mezerníky [47]

1.3.1 Izolace DNA

Zásadním krokem pro úspěšnou PCR detekci fungálních patogenů v klinických vzorcích je izolace DNA. Cílem izolačních procesů je získat nukleovou kyselinu v dostatečném množství a čistotě. Kvalita izolovaného materiálu často rozhoduje o úspěšnosti navazujících postupů. Prvním krokem při izolaci DNA je lýza buněk, ze kterých chceme nukleové kyseliny získat. Pro lýzu houbových buněk se často využívá mechanická dezintergrace buněčné stěny v kombinaci s působením degradačních enzymů, např. protřepávání na vortexu se skleněnými kuličkami. Po destrukci buněčné stěny se DNA uvolňuje do extrakčního pufru, který kromě detergentů obsahuje chelatační činidlo (EDTA). Chelatační činidlo působí jako inhibitor nukleáz. Vzniklý extrakt využijeme k získání DNA, kterou lze izolovat různými postupy [44,48,49,50].

Metody izolace nukleových kyselin využívají rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul, adsorpce na pevný podklad nebo ultracentrifugace v gradientních roztocích. Pro izolaci aspergilové DNA byla v této práci použita metoda adsorpce na silikát [49,50].

1.3.1.1 Metoda adsorpce na silikát

Izolace nukleových kyselin probíhá na chromatografických kolonkách, které jsou často vsazeny do centrifugačních mikrozkušavek a kombinují tak chromatografii s centrifugací.

Metoda je založena na zjištění, že DNA v přítomnosti chaotropních solí (jodid sodný, guanidin thiokyanát) adheruje na silikátový povrch. Ten se dodává jako drobné skleněné kuličky nebo jako fritový filtr. Interakce je založena na afinitě kladně nabitých chemických skupin nosiče k negativně nabitým zbytkům kyseliny fosforečné v molekule DNA. Během imobilizace nukleových kyselin na nosiči jsou odmyty nežádoucí molekuly. V dalším kroku je DNA z křemičité membrány vymyta a připravena pro PCR reakci. Roztok DNA se krátkodobě uchovává při 4°C. Pro dlouhodobé skladování slouží hlubokomrazicí boxy (-20°C nebo -70°C) [49,50].

Nukleové kyseliny izolované prostřednictvím chromatografických technik mají dobrý stupeň čistoty. Výhodou metody založené na adsorpci na silikát je rychlost a spolehlivost, proto jsou na ní založeny komerční soupravy (QIAamp DNA Blood Kit, FastDNA Kit) pro rutinní extrakce DNA. Kity jsou optimalizovány pro použití na konkrétní typ a množství vzorku a poskytují standardizované výsledky. Problémem těchto souprav bývá právě jejich úzká specializace na určitý typ materiálu a rovněž vysoká cena. Perspektivní jsou soupravy nabízející automatizovanou izolaci vysoce čisté DNA, např. technika MagNA Pure LC [34,36,49,50,51,52].

1.3.2 Amplifikační metody

1.3.2.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je enzymová metoda umožňující mnohonásobné namnožení vybraného úseku DNA *in vitro*. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy, které vykazují dostatečnou enzymovou aktivitu po celou dobu reakce. Činnost enzymu zajišťuje pufr, za přítomnosti Mg^{2+} ve formě $MgCl_2$ nebo $MgSO_4$. Stavebními složkami nově syntetizovaných fragmentů DNA jsou deoxynukleotid trifosfáty (dNTP). Pár primerů (synteticky připravené oligonukleotidy) ohraničí oblast DNA, která má být namnožena [53].

PCR je cyklické opakování tří základních kroků (denaturace, anelace a elongace DNA) trvajících 30 – 120 sekund a vyznačujících se rozdílnými teplotami. Počet cyklů závisí na množství templátové DNA, obvykle se pohybuje v rozmezí 20 – 40 cyklů. Cyklické změny teplot reakční směsi lze řídit automatizovaně v termocykléru. Mikrozkmavky nebo destičky

s reakční směsí jsou v termocykleru uloženy v kovovém bloku (využívající Peltierova efektu), jehož teplota je řízena podle programu nastaveného uživatelem. Produkty PCR jsou potom dále detekovány dalšími metodami (různé typy elektroforéz, hybridizační metody, sekvenování atd.) [53,54].

Výhodou PCR je zejména jednoduchost provedení, neboť řízení reakce je automatizováno v termocykleru, a rychlost získání výsledku. PCR je velice citlivá, vyžaduje jen nepatrné množství vstupní DNA. Z tohoto důvodu je však citlivá i ke kontaminaci a možné dezinterpretaci výsledku, a proto kvalita provedení musí být striktně dodržována a kontrolována [31,34,36].

1.3.2.2 Uhnížděná PCR (nested PCR)

Ke zvýšení citlivosti a přesnosti stanovení bývá používána metoda tzv. uhnížděné PCR. Je založena na dvou po sobě následujících amplifikačních reakcích. Templátem první reakce je DNA izolovaná z testovaného vzorku, templátem druhé reakce je produkt reakce první [53]

Výhodou této techniky je již zmiňovaná vysoká citlivost a specifita. Uhnížděná PCR je ve srovnání s real-time PCR méně náročná na vybavení (běžný cykler) a je provozně méně nákladná, avšak časově náročnější. Otevírání zkumavek a přenos vzorků po první fázi amplifikace zvyšuje riziko kontaminace spojené s vydáváním falešně pozitivních výsledků [5,9,34,55].

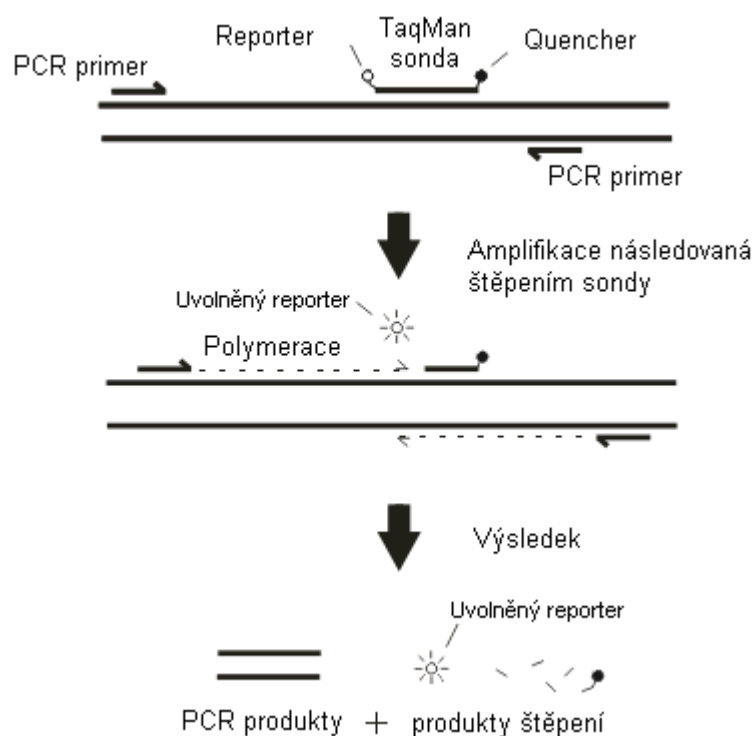
1.3.2.3 Kvantitativní PCR v reálném čase (real-time PCR)

Principem real-time PCR je rychlé a přesné zaznamenávání produktů PCR bezprostředně po jejich vzniku, v každém jednotlivém cyklu PCR. K detekci vznikajícího produktu mohou být použity různé systémy, které jsou založeny na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace [53].

Jednou z metod umožňujících kvantitativní detekci produktu v průběhu PCR je systém TaqMan (schéma viz obrázek pod textem). Sondy TaqMan jsou oligonukleotidy, jež mají na 5' konci navázané fluorogenní barvivo (reporter) a na 3' konci zhášec (quencher), který u intaktní sondy tlumí záření emitované reporterem. K tomuto jevu dochází pouze v případě, že sonda je v neporušeném stavu a vzdálenost mezi fluorochromy je minimální. Pokud se sonda

naváže na specifický komplementární úsek ve vnitřní části amplifikované sekvence, je odbourána 5' exonukleázovou aktivitou *Taq* DNA-polymerázy, reporter se vymaní z tlumivého vlivu quencheru a emituje fluorescenci. K nárůstu intenzity fluorescence reakční směsi dochází tedy v závislosti na počtu vzniklých amplikonů, což lze monitorovat přímo během reakce. Výsledkem měření je křivka, z jejíhož průběhu je možné odvodit původní množství DNA ve vzorku [12,36,50,55,56,57].

Z klinického hlediska je použití uvedené varianty výhodné především pro možnost porovnávání nálože cílové DNA v postupně odebíraných vzorcích, což má význam při monitorování průběhu infekce a sledování účinnosti léčby. Použití fluorimetru přímo integrovaného do moderních termocyklerů, vybavených vysoce účinným mechanismem změny teploty, dále významně zkracuje časový interval potřebný k získání výsledku a navíc redukcí postamplifikačních manipulací snižuje riziko falešně pozitivních výsledků. Hlavním limitem této metody je vysoká pořizovací cena [12,16,29,31,34,36,37,56,58].



Obr.č. 3: Schéma systému TaqMan; upraveno [59]

2 CÍL PRÁCE

Optimalizace real-time PCR za účelem detekce DNA rodu *Aspergillus* v tělesných tekutinách a tkáních:

- (1) Přímá detekce DNA rodu *Aspergillus* v klinických vzorcích metodou real-time PCR
- (2) Porovnání výsledků získaných metodou real-time PCR s klinickými údaji a s výsledky ELISA detekce galaktomannanu

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Izolace DNA z klinických vzorků

Za účelem minimalizace rizika kontaminace probíhalo zpracování biologického materiálu a manipulace s reagenčními roztoky v laminárním boxu, pro pipetování byly použity aerosol rezistentní špičky.

3.1.1 Metoda izolace z tkáně

Pro izolaci aspergilové DNA z tkání byla použita komerční diagnostická souprava UltraClean Tissue DNA (Mo Bio). Při přípravě vzorků bylo postupováno podle instrukcí výrobce. Zkumavky se vzorky a rozbíjecím pufrem byly vortexovány v horizontální poloze po dobu 15 minut. Po odstředění byly vzorky přeneseny na kolonky v mikrozskumavkách, následovalo navázání DNA na křemičitou membránu, byl proveden promývací krok. Čistá DNA byla vymyta Tris pufrem po 5 minutách inkubace při laboratorní teplotě. Před uskladněním byly otevřené vzorky ponechány 5 minut v termobloku nastaveném na teplotu 75°C. Do použití k PCR detekci byl vzorek o objemu 50 µl skladován při -20 °C.

3.1.2 Metoda izolace ze séra

DNA byla izolována z 800 µl séra pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) využívající lytický pufr, proteázu a zahřátí na teplotu 56 °C pro degradaci buněčné stěny a denaturaci proteinů. Po inkubaci byl k lyzátu přidán ethanol, vzorky byly promíchány na vortexu a přeneseny na filtrační kolonky. Promytí navázané DNA proběhlo ve dvou krocích za použití centrifugy. DNA byla z kolonky vymyta 2×110 µl elučního pufru.

Pro zvýšení citlivosti detekční metody bylo provedeno zkoncentrování získaného izolátu DNA pomocí soupravy DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research). Roztok izolované DNA (12 µl) byl skladován při -20 °C. K následné detekci specifické aspergilové DNA metodou PCR byly použity 2 µl izolátu.

3.2 Kvantitativní PCR v reálném čase

3.2.1 Amplifikace aspergilové DNA

Pro stanovení *A.spp.* DNA byla použita metoda real-time PCR na přístroji Mx3000P (Stratagene) využívající specifické fluorescenční sondy (formát TaqMan). Systém amplifikuje část sekvence 28S rRNA genu (GenBank AJ438345). Podmínky PCR reakce byly nastaveny podle manuálu výrobce. Fluorescence vzorků byla měřena v každém cyklu na konci nasedání primerů. Jako standard a kontrola amplifikace byla vždy zahrnuta diluční řada genomové DNA *A. fumigatus*. Pro kontrolu inhibice slouží rekombinantní plazmidová DNA *Arabidopsis thaliana* použitá podle protokolu Laboratoře buněčné biologie při pediatrické klinice 2.LF FN Motol. Jako negativní kontrola byl použit odpovídající objem vzorku sterilní deionizované vody.

PCR Primery: [C9]

ASF1 21-mer 5'-GCA CGT GAA ATT GTT GAA AGG-3' (392–412 bp, fwd)

ADR1 16-mer 5'-CAG GCT GGC CGC ATT G-3' (560–575 bp, rev)

Hydrolyzační sonda:

ASP28P 24-mer 5'-FAM-CAT TCG TGC CGG TGT ACT TCC CCG-TAMRA-3'
(453–486 bp)

Složení reakční směsi pro PCR rodu *Aspergillus*:

Složka	Objem v μl	Výsledná koncentrace
H ₂ O	3,4	
qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio)	10,0	1x
ASF1+ADR1 primer [10 μM]	1,5	0,75 μM
50% Glycerol p.a.	2,0	5%
Templátová DNA	2,0	
Sonda ASP28P [10 μM]	0,8	0,4 μM
ROX [2 μM]	0,3	30 nM
Celkový objem master mixu	20,0	

Teplotní profil PCR reakce:

Úvodní denaturace: 94°C - 3 min

Následuje 50 cyklů:

Denaturace 94°C - 15 s

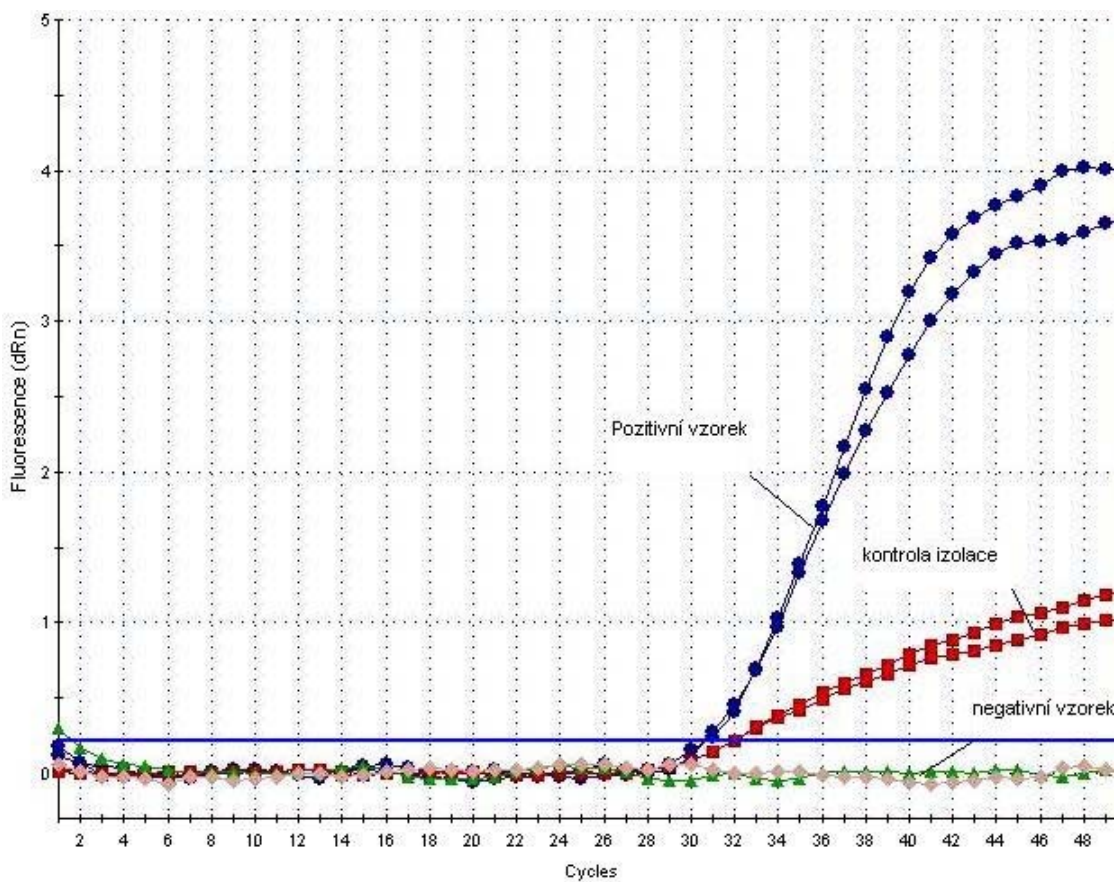
Anelace + Elongace 60°C - 1 min

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Zavedení a optimalizace metody real-time PCR

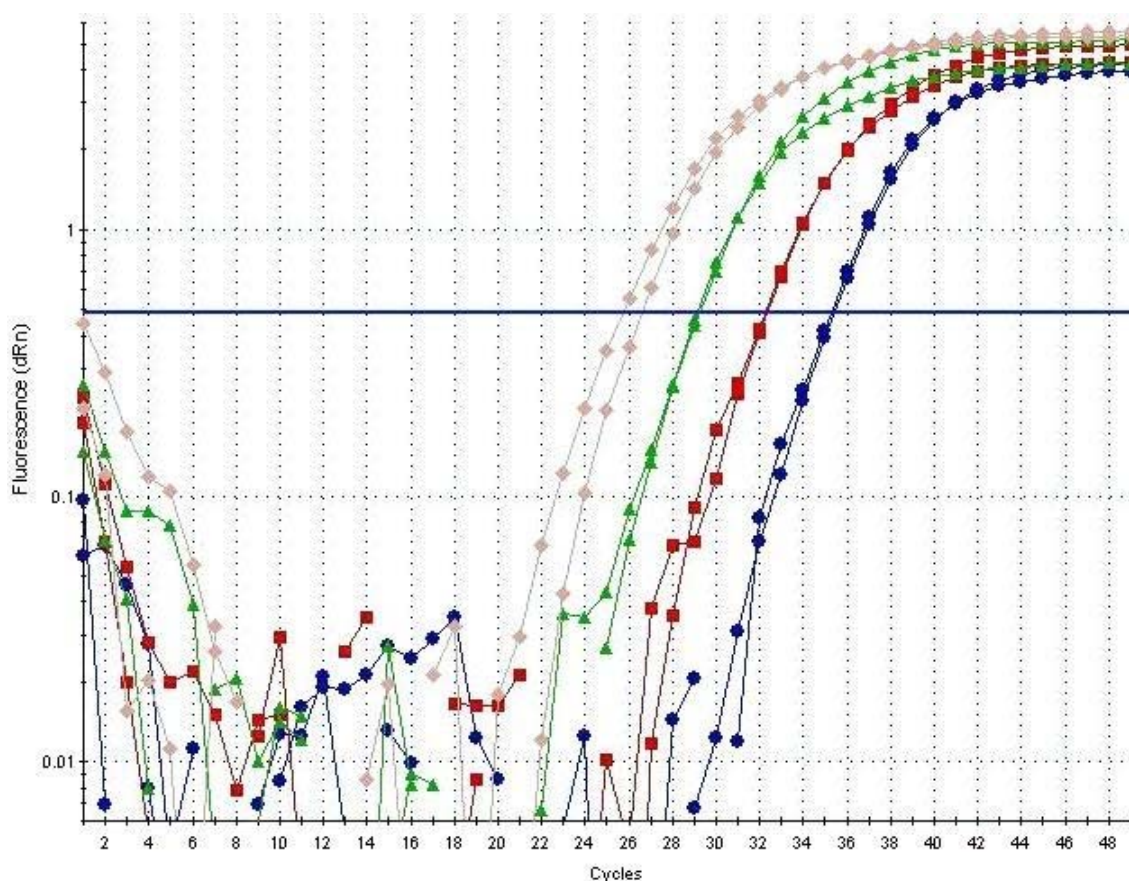
Při zavádění metody jsme vycházeli z práce White P.L. *et al.* (2006) [33].

Na obrázku č. 4 je grafické znázornění amplifikační křivky, v ideálním případě má křivka esovitý (sigmoidální) průběh. Amplifikační křivka ukazuje fluorescenci každého reakčního cyklu. Detekční práh (threshold) je vyznačen modrou horizontální linií v grafu. Tato linie udává tzv. prahový cyklus (Ct, cycle threshold) pro jednotlivé vzorky. Porovnání odečtených hodnot Ct s kalibrací umožní kvantifikaci vzorků o neznámém množství cílové DNA. Pro srovnání je uveden záznam amplifikace pozitivního a negativního klinického vzorku s kontrolou izolace.



Obr. č. 4: Závislost intenzity fluorescenčního signálu na počtu amplifikačních cyklů.

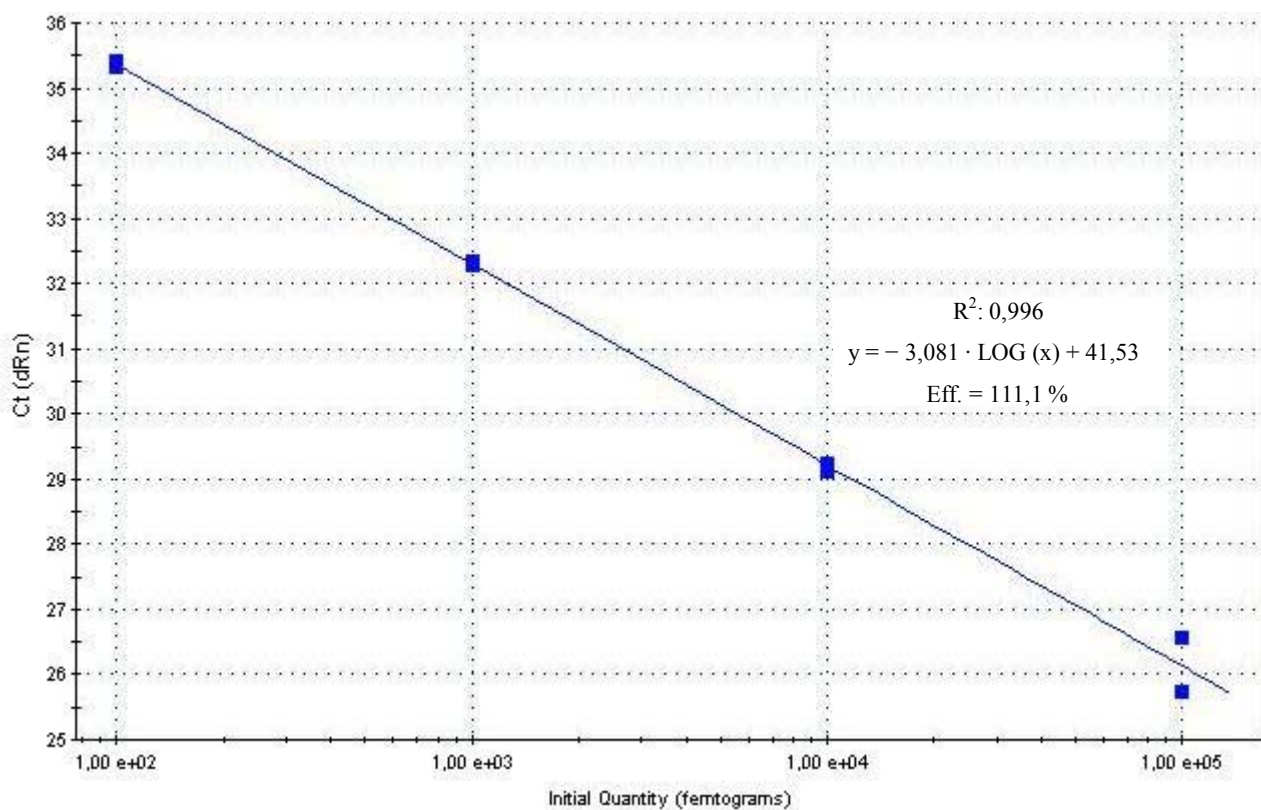
V rámci optimalizace real-time PCR metody byla sestrojena a vyhodnocena kalibrační řada. K sestrojení kalibrační křivky byla použita genomová DNA izolovaná z narostlé kultury *A. fumigatus*. Koncentrace získané DNA byla změřena spektrofotometricky. Ředící řada sestávala ze čtyř vzorků s koncentracemi od 10^2 do 10^5 fg DNA/ml. Pro ověření reprodukovatelnosti metody byly vzorky měřeny v duplikátech. Výsledná kalibrační křivka je lineární ($R^2 = 0,996$; směrnice = $-3,081$), amplifikace dosahuje dobré účinnosti (111,1%) a rozptyl výsledků opakovaných měření je nízký (viz Obr. 5, 6 a Tab. 5). Systém lze tedy považovat za optimalizovaný.



Obr. č. 5: Amplifikační křivky standardů. Legenda: šedě 10^5 fg/ml, zeleně 10^4 fg/ml, červeně 10^3 fg/ml, modře 10^2 fg/ml.

Vzorek	Replikát	Ct	Ct Avg.	Ct SD	Množství DNA (fg)	R ²	Směrnice
standard 1	1	35,43	35,37	0,08	1,00E+02	0,996	-3,081
	2	35,31	35,37	0,08	1,00E+02	0,996	-3,081
standard 2	1	32,34	32,31	0,04	1,00E+03	0,996	-3,081
	2	32,28	32,31	0,04	1,00E+03	0,996	-3,081
standard 3	1	29,23	29,18	0,08	1,00E+04	0,996	-3,081
	2	29,12	29,18	0,08	1,00E+04	0,996	-3,081
standard 4	1	25,72	26,15	0,6	1,00E+05	0,996	-3,081
	2	26,57	26,15	0,6	1,00E+05	0,996	-3,081

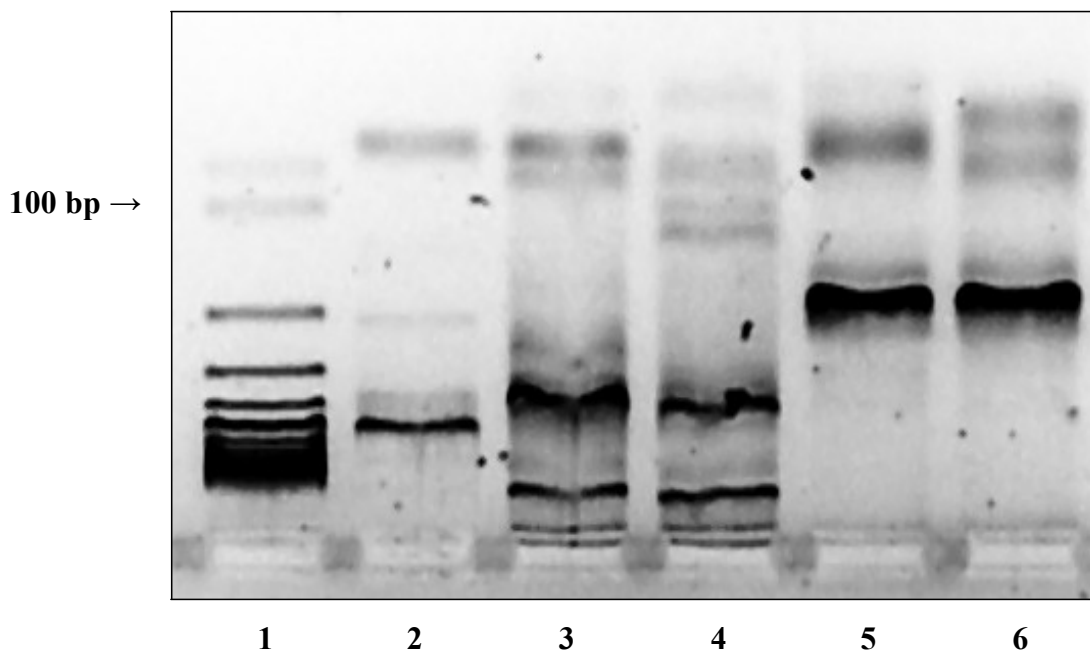
Tab. č. 5: Amplifikace standardních vzorků - statistické vyhodnocení výsledků.



Obr. č. 6: Kalibrační řada – závislost C_t na logaritmu původního množství aspergilové DNA u čtyř známých vzorků.

Specificita zaváděné metody byla ověřena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu po obarvení ethidium bromidem. Cílem bylo zjistit, zdali se primery použité v PCR reakci nemohou vázat na templátovou DNA jiných organismů a poskytnout tak nespecifické amplikony. Výsledky na obrázku 7 ukazují, že specificitu použitých primerů lze považovat za dostačující.

Testování citlivosti nebylo v rámci této práce provedeno, nicméně z vyšetřování klinických vzorků vyplývá, že detekční limit metody se pohybuje na úrovni 1 fg aspergilové DNA v reakční směsi. Toto množství odpovídá méně než jednomu genu *A. fumigatus* („genome mass“ 32 fg). Citlivost je takto vysoká, protože cílová sekvence 28S rRNA genu se nachází v aspergilovém genomu ve vysokém počtu kopií [36].



Obr. č. 7: Stanovení specificity PCR – detekce na agarózové elektroforéze.

Dráha 1: velikostní standard

Dráha 2: *Mucor* spp. DNA

Dráha 3,4: lidská DNA

Dráha 5,6: *Aspergillus* spp. DNA

4.2 Testování klinických vzorků a porovnání výsledků PCR s detekcí galaktomannanu metodou ELISA

4.2.1 Záchyt aspergilové DNA v klinických vzorcích

Celkem bylo vyšetřeno 109 vzorků od 23 pacientů s podezřením na invazivní aspergilózu. Převážnou většinu tvořili pacienti dětské hematologie (21 pacientů) a po jednom byly zastoupeni dospělí pacienti z hematologického a anesteziologicko-resuscitačního oddělení. Mezi vyšetřovaným materiálem převažovaly vzorky séra v počtu 79, následovalo 20 vzorků tkáně, 4 vzorky likvoru, 2 vzorky punktátu hrudníku a po jednom vzorku BAL, ETR, aspirátu z DCD a plné krve. Od většiny pacientů byly vzorky odebírány opakovaně. Jako pozitivní bylo hodnoceno celkem 15 vzorků (13,7%) od 7 pacientů. Z hlediska druhu pozitivních vzorků, v 6 případech se jednalo o vzorky tkáně, dále 5 vzorků séra, v 1 případě byl pozitivní likvor, hrudní punktát, ETR a aspirát z DCD. Výsledky naměřené metodou real-time PCR byly přepočítány na počet fg DNA aspergila (1 genome mass odpovídá 32 fg). Nejvyšší nálož aspergilové DNA byla pozorována ve vzorcích tkáně (viz tabulka na následující straně).

Č. pac.	Č. vz.	Tkáň	fg
1. Pacient	1.	tenké střevo	6 119 600
	2.	plice	3 626 804
	3.	žaludek	617 011
	4.	játra	2 715
	5.	pankreas	124
	6.	kůra ledviny	61
	7.	jazyk	0
	8.	tlusté střevo	0
	9.	dřeň ledviny	0
2. Pacient	10.	mozek	207
	11.	mozek	0
3. Pacient	12.	játra	0
	13.	kůra ledviny	0
	14.	dřeň ledviny	0
	15.	žaludek	0
	16.	plice	0
4. Pacient	17.	levá plíce	0
	18.	pravá plíce horní lalok	0
	19.	pravá plíce dolní lalok	121
5. Pacient	20.	paranazální dutiny	107 136

Tab. č. 6: Výsledky detekce DNA r. *Aspergillus* ve vzorcích tkáně metodou real-time PCR.

Klinicko-patologické poznámky k pacientům z Tab. 6:

Pac.č. 1 a 4 (pac.č. 8 v Tab. 7) zemřeli na následky invazivní aspergilózy (diagnóza byla potvrzena histologicky i kulturačně).

Pac. č. 2 (pac. č. 2 z Tab. 7) v případě vzorku č. 10 se jednalo o mozkový absces prokazatelně aspergilové etiologie (kultivace, histologie), kdy se po odléčení objevil znovu mozkový absces neznámé etiologie, ze kterého byl vzat vzorek č. 11 (GM likvoru 2x pozitivní, kultivace tkáně a hnisu negativní, PCR likvor a tkáň negativní, případ dosud nebyl uzavřen).

Pac. č. 3 zemřel z jiných příčin.

Pac. č. 5 PCR nálezy byly potvrzeny později kulturačně.

4.2.2 Porovnání detekce DNA aspergila s ELISA detekcí galaktomannanu

Pro ověření využitelnosti metody real-time PCR na klinických vzorcích bylo u vybraných pacientů souběžně provedeno testování galaktomannanu metodou ELISA. Oběma technikami bylo vyšetřeno celkem 87 vzorků. Z tohoto počtu bylo 74 hodnoceno oběma metodami jako negativní, 2 vzorky oběma metodami jako pozitivní. 5 vzorků bylo pozitivní na DNA a negativní na GM, 6 dalších bylo naopak pozitivní na GM a negativní na DNA. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7, pro přehlednost jsou uvedeni pouze pacienti s nejméně jedním pozitivním nálezem.

Vysoká citlivost real-time PCR techniky představuje problém při interpretaci pozitivních výsledků s nízkou náloží aspergilové DNA ve vyšetřovaném vzorku. Tato pozitivita může mít více příčin a nemusí vždy vypovídat o přítomnosti invazivní houbové infekce u konkrétního pacienta. Příčinou falešně pozitivních výsledků ve vztahu k infekčnímu procesu může být kontaminace během odběru nebo zpracování vzorku, protože konidie aspergilů se běžně vyskytují ve vzduchu. Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytovat u kolonizovaných pacientů (zejm. plíce a GIT). Z těchto důvodů nelze považovat za signifikantní ojedinělý PCR pozitivní výsledek, význam metody spočívá především ve sledování rizikových pacientů, kdy pomáhá odhadnout pravděpodobnost aspergilové infekce a usnadňuje tak rozhodování o zahájení antimykotické léčby. Monitorování změn nálože houbové DNA se zdá být užitečné při posuzování léčebné odpovědi [34,41,58,60].

Metody použité v této práci detekují různé komponenty aspergila (nukleová kyselina a součást buněčné stěny patogenu), citlivost každé z obou metod může být tedy odlišná v různých fázích infekčního procesu a antimykotické terapie. Proto nelze jednoznačně určit, že metodou volby je pouze sérologická nebo PCR detekce. Při paralelním vyšetření vzorků na DNA i GM by mohla být pravděpodobně eliminována část falešně pozitivních výsledků [5,58].

Spolehlivému hodnocení real-time PCR metody v našem uspořádání brání nízký počet vyšetřených pacientů s prokázanou diagnózou invazivní aspergilózy. Výsledky této práce jsou pouze předběžné, vyhodnocení obou metod vyžaduje testování většího počtu vzorků a sběr klinických dat.

Č. pac.	Č. vz.	Datum odběru	Materiál	ELISA GM	PCR fg/ml
Pacient č. 1	1.	071025	sérum	neg	2 215
	2.	071030	sérum	neg	0
	3.	071105	sérum	neg	0
	4.	071121	likvor	neg	54
	5.	071122	sérum	neg	0
	6.	071126	sérum	neg	48
	7.	071129	sérum	neg	0
	8.	071203	sérum	neg	0
	9.	071205	sérum	neg	0
	10.	071210	sérum	neg	0
	11.	071213	sérum	neg	0
Pacient č. 2	12.	071231	sérum	neg	114
	13.	080103	sérum	0,48	0
	14.	080107	sérum	1,17	0
	15.	080110	sérum	1,74	0
	16.	080114	sérum	3,86	0
	17.	080228	likvor	6,32	2 090
	18.	080328	likvor	0,91	0
Pacient č. 3	19.	071025	sérum	neg	0
	20.	071122	sérum	neg	0
	21.	071203	sérum	neg	149
	22.	071205	sérum	neg	0
	23.	071210	sérum	neg	0
Pacient č. 4	24.	080207	sérum	neg	0
	25.	080211	sérum	neg	0
	26.	080214	sérum	neg	90
	27.	080218	sérum	neg	0
Pacient č. 5	28.	?	likvor	poz	0
Pacient č. 6	29.	071025	sérum 1	neg	75
	30.	071025	sérum 2	neg	38
	31.	071025	hrudní punktát 1	neg	46
	32.	071025	hrudní punktát 2	neg	6 497
Pacient č. 7	33.	070828	sérum	poz	0
	34.	070830	sérum	neg	0
	35.	0709	sérum	neg	0
	36.	0709	sérum	neg	0
	37.	071122	sérum	neg	0
	38.	071129	sérum	neg	0
	39.	071203	sérum	neg	0
	40.	071217	sérum	neg	0
	41.	071219	sérum	neg	0
	42.	071228	sérum	neg	0
Pacient č. 8	43.	070720	sérum	0,12	103
	44.	070723	sérum	0,44	173
	45.	070730	sérum	8	24 074

Tab. č. 7: Výsledky real-time PCR a GM-ELISA.

Klinicko-patologické poznámky k pacientům z Tab. 7:

Pac.č. 1 se v době pozitivních PCR výsledků potýkal s vážnou CMV infekcí. Náběr číslo jedna byl udělán v době, kdy došlo k iatrogennímu pneumotoraxu a kolapsu plíce. Předpokládáme, že pozitivní výsledky zde korelovaly s jiným závažným stavem.

Pac. č. 2 (pac č. 2 z Tab. 6) vzorky z období prosince 07 až února 08 korelují s výskytem mozkového abscesu aspergilového původu. Výrazná disproporce mezi GM a PCR může být dána odlišnou kinetikou nebo nevhodným skladováním vzorků pro PCR (šlo o zbytky po GM zpracované ex post). Poslední vzorek od tohoto pacienta z března vykazuje pozitivní hodnotu GM po krátkém období GM negativity a zároveň dochází ke vzniku mozkového abscesu neznámé etiologie – tentokrát PCR i kultivačně negativní.

Pac. č. 3 a 4 reprezentují pravděpodobně výskyt falešných pozitivit PCR (ať už daných kontaminací či kolonizací).

Pac. č.5 a 7 pravděpodobně jde o falešnou pozitivitu na vrub GM .

Pac.č.6 zde se jednalo o pacienta z anesteziologicko-resuscitačního oddělení s rozpadovým procesem plic nejasné etiologie, *Aspergillus* byl jedním z detekovaných možných patogenů.

Pac. č.8 (pac č. 1 z Tab. 6) zde šlo o rychle progredující IA s fatálním koncem.

ZÁVĚR

- Podařilo se nám zavést a optimalizovat metodu real-time PCR pro rychlou kvantitativní detekci DNA rodu *Aspergillus* v klinických vzorcích.
- Tato metoda je citlivá a umožňuje určit množství cirkulující aspergilové DNA. To má své potencionální využití pro sledování nástupu IA a její reakce na léčbu.
- Dále byl zpracován soubor pacientů za časové období červenec 2007 – březen 2008. Vzhledem k malému množství jasně definovaných IA pozitivních pacientů nejsme zatím schopni stanovit pozitivní a negativní predikční hodnotu dané metody.
- Problémem může být interpretace výsledků PCR a neznalost kinetiky i formy DNA hub v oběhu. Nicméně získané výsledky naznačují ve shodě s mnoha jinými pracemi, že PCR metody své uplatnění v diagnostice a sledování mykotických infekcí najdou.

LITERATURA A PRAMENY

1. Richardson M.D., Warnock D.W. Fungal infection – diagnosis and management. Blackwell Publishing, Oxford UK 2003.
2. Haber J. Invazivní aspergilóza – nové možnosti léčby. *Sanquis* 2004; 36:40.
3. Drgoňa L. et al. Diagnostika a liečba invazívnych mykóz. *Metodický list racionálnej farmakoterapie* 2005; 9(3-4).
4. http://www.genex.cz/upload/Genex_molekularni_diagnostika.pdf
5. Hamal P. Rychlá detekce a epidemiologie nozokomiální invazivní aspergilózy. Univerzita Palackého v Olomouci, Praha: IGA MZ ČR, 2006.
6. Bolehovská R. et al. Detection of *Aspergillus* spp. in biological samples by real-time PCR. *Biomed Pap* 2006; 150(2):245-248.
7. Michálek J. et al. Rychlý záchyt invazivní mykotické infekce s využitím metody polymerázové řetězové reakce u dětí se zhoubným nádorovým onemocněním. *Klinická onkologie* 2000; 13(6):187-190.
8. Haber J. et al. Systémové mykózy a jejich léčba. Galén, Praha 1995.
9. Jedličková A. Systémové mykózy – průvodce ošetřujícího lékaře. Maxdorf, Praha 2006.
10. Mayer J., Vorlíček J., Kovařík A. Diagnostika hlubokých mykotických infekcí u onkologických pacientů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Závěrečná zpráva grantu č. 3037-2 IGA MZ ČR, Brno 1997.
11. Koďoušek R. Mykózy – lékařsky významná mykotická onemocnění člověka. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2003.
12. Malíř F. Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, Brno 2003.
13. Denning D.W. Invasive Aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26:781-805.
14. Denning, D.W. et al. Sequencing the *Aspergillus fumigatus* genome. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(4):251-253.
15. Latgé J.P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 310-350.
16. Denning D.W. Aspergillosis. Schering-Plough Corporation, Manchester, UK 2006.

17. Warris A., Verweij P.E. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Med Mycol* 2005; 43:59-65.
18. Hohl T.M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell* 2007; 6(11):1953-1963.
19. Latgé J.P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* 2001; 9(8):382-389.
20. Denning, D.W. et al. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:609-622.
21. Bednář M. Lékařská mikrobiologie – Bakteriologie Virologie Parazitologie. Marvil, Praha 1996.
22. <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-fu.htm>
23. <http://www.aspergillus.org.uk>
24. Tomšíková A. Nové poznatky v diagnostice mykóz. Univerzita Karlova, Praha 2006.
25. Nierman W.C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2005; 438:1151-1156.
26. Enoch D.A. et al. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 2006; (55):809-818.
27. Zazula R. et al. Současný pohled na mykotické plicní infekce. *Interní medicína pro praxi* 2005; (7 –8):349-353.
28. Mayer J., Skříčková J., Vorlíček J. Postižení plic u imunokompromitovaných nemocných – diferenciální diagnostika a využití bronchoalveolární laváže. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno 1995.
29. Chamilos G., Kontoyiannis D.P. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2006; 44:163-172.
30. Alexander B.D., Pfaller M.A. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin Infect Dis* 2006; 43:15-27.
31. Buchheidt D., Hummel M. *Aspergillus* polymerase chain reaction (PCR) diagnosis. *Med Mycol* 2005; 43:139-145.
32. Ascoglu S. et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34:7-14.

33. White P.L. et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *J Mol Diagn* 2006; 8(3):376-384.
34. Bretagne S., Costa J.M. Towards a nucleic acid-based diagnosis in clinical parasitology and mycology. *Clinica Chimica Acta* 2006; 363:221-228.
35. White P.L. et al. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis* 2006; 42:479-86.
36. Hamal P. Molekulárně genetické metody v lékařské mykologii: současný stav a perspektivy. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* 2007; 13(5):136-144.
37. Verweij P.E. Advances in diagnostic testing. *Med Mycol* 2005; 43:121-124.
38. Pickering J.W. et al. Evaluation of a (1→3)-β-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12):5957-5962.
39. Latgé J.P. et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994; 62(12):5424-5433.
40. Ráčil Z. et al. Využití detekce galaktomannanu pro časnou diagnostiku invazivní aspergilózy. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* 2007; 13(5):176-183.
41. Marr K.A., Leisenring W. Design issues in studies evaluating diagnostic tests for aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2005; 41:381-386.
42. Pinel C. et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5):2184-2186.
43. Roilides E. Early diagnosis of invasive aspergillosis in infants and children. *Med Mycol* 2006; 44:199-205.
44. Lengerová M. et al. Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR – přednosti a úskalí. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* 2007; 13(5):184-189.
45. Atkins S.D., Clark I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J Appl Genet* 2004; 45(1):3-15.
46. Williamson E.C.M. et al. Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 2000; 108:132-139.
47. Cullings K.W., Vogler D.R. A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Molecular Ecology* 1998; 7:919-923.

48. Fredricks D.N. et al. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43(10):5122-5128.
49. Kočárek E. Molekulární biologie v medicíně. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, Brno 2007.
50. Šmarda J. Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita, Brno 2005.
51. Griffiths L.J. et al. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *J Med Microbiol* 2006; 55(9):1187-1191.
52. <http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm>
53. <http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf>
54. Bacovská Z. Molekulárně biologický průkaz DNA *Aspergillus fumigatus* metodou PCR v klinických vzorcích. FAF, Hradec Králové 2005.
55. Pavlík E. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku. *Labor Aktuell*, kapitola 3.,5.
56. Mackay I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:190-212.
57. Espy et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1):165-256.
58. Pham A.S. et al. Diagnosis of invasive mold infection by real-time quantitative PCR. *Am J Clin Pathol* 2003; 119:38-44.
59. <http://www.gene-quantification.com>
60. Kami M. et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1504-12.

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AmB	amfotericin B
ABPA	alergická bronchopulmonální aspergilóza
Avg	průměr
BAL	bronchoalveolární laváž
BDG	beta-(1,3)-D-glukan
bp	pár bází
CD	cluster of differentiation
CMV	cytomegalovirus
Ct	threshold cycle
DCD	dolní cesty dýchací
DHN	dihydroxynaftalen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
Eff	účinnost
EIA	enzymová imunoanalýza
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay enzymoimunoanalýza s kotveným reaktantem
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
ETR	endotracheální aspirát
FAM	6-karboxy-fluorescein
fg	femtogram
fwd	forward
GM	genome mass
GM	galaktomannan
GIT	gastrointestinální trakt

GVHD	reakce štěpu proti hostiteli
IA	invazivní aspergilóza
IFICG	Invasive Fungal Infections Cooperative Group
IP	index pozitivity
IGC	intergenic spacer
ITS	internal transcribed spacer
JIP	jednotka intenzivní péče
kDa	kilodalton
Mb	megabáze
MSG	Mycoses Study Group
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
OD	optická denzita
PCR	polymerázová řetězová reakce
rev	reverse
R ²	Pearsonův korelační koeficient
Rn	normalizovaná fluorescence
ROX	6-karboxyl-X-rhodamin
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
S	Svedbergova jednotka
SD	směrodatná odchylka
SGA	Sabouraudův glukózový agar
Taq	Thermus aquaticus
TAMRA	6-karboxy-tetramethyl-rhodamin
TE	Tris-EDTA
TIGR	The Institute for Genomic Research
UV	ultra violet
WTSI	The Wellcome Trust Sanger Institute