

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Špela GOLOBIČ

**PRIMERJAVA DVEH MOLEKULARNIH METOD ZA  
DOKAZOVANJE *Aspergillus* spp. IZ VZORCEV  
SPODNJIH DIHAL**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Špela GOLOBIČ

**PRIMERJAVA DVEH MOLEKULARNIH METOD ZA  
DOKAZOVANJE *Aspergillus* spp. IZ VZORCEV SPODNJIH DIHAL**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF TWO MOLECULAR METHODS FOR  
DETECTION OF *Aspergillus* spp. FROM LOWER RESPIRATORY  
TRACT SAMPLES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana doc. dr. Tadeja Matos, dr. med. in za recenzentko prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Mentorica: doc. dr. Tadeja Matos, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Tadeja Matos, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med., spec. klin. mikrobiol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Špela Golobič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.61:616-078:577.2.083:582.282.123.4(043)=163.6
KG	invazivna aspergiloza/ <i>Aspergillus</i> spp./diagnostične metode/molekularna diagnostika/PCR v realnem času/občutljivost PCR v realnem času/specifičnost PCR v realnem času
AV	GOLOBIČ, Špela
SA	MATOS, Tadeja (mentorica)/RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	PRIMERJAVA DVEH MOLEKULARNIH METOD ZA DOKAZOVANJE <i>Aspergillus</i> spp. IZ VZORCEV SPODNJIH DIHAL
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 56 str., 23 pregl., 10 sl., 47 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Glive rodu <i>Aspergillus</i> so oportunistične plesni, ki povzročajo širok spekter bolezni in stanj. Pri imunsko oslabljenih ljudeh lahko povzročajo smrtno nevarno okužbo, ki jo imenujemo invazivna aspergiloza. Najpogosteje prizadene pljuča. Za dokazovanje <i>Aspergillus</i> spp. se uporablja takoj klasične metode; neposredne tehnike barvanja kliničnih vzorcev, kultura, dokazovanje različnih komponent celic, kot tudi molekularne tehnike. Verižna reakcija s polimerazo v realnem času omogoči kvantifikacijo glivične obremenitve v kliničnem vzorcu, kar nam poda informacije o bremenu ali napredovanju bolezni. V nalogi sem primerjala dve metodu PCR, komercialno dostopni kit MycAssay <sup>TM</sup> <i>Aspergillus</i> (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) z »in-house« metodo. »In-house« metoda je sicer cenejša in bolj dostopna, ima enako občutljivost in specifičnost kot komercialno dostopni kit. Molekularne metode bi zaradi velikega deleža lažno negativnih rezultatov še zmeraj dopolnili z osamitvijo glive iz kulture.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.61:616-078:577.2.083:582.282.123.4(043)=163.6
CX	invasive aspergillosis/ <i>Aspergillus</i> spp./molecular diagnostics/real-time PCR/specification of real-time PCR/sensitivity of real-time PCR
AU	GOLOBIČ, Špela
AA	MATOS, Tadeja (supervisor)/RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2012
TI	COMPARISON OF TWO MOLECULAR METHODS FOR DETECTION OF <i>Aspergillus</i> spp. FROM LOWER RESPIRATORY TRACT SAMPLES
DT	Graduation Thesis (university studies)
NO	X, 56 p., 23 tab., 10 fig., 47 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Fungi of the <i>Aspergillus</i> genus are opportunistic molds that cause a wide range of diseases and conditions. In immunocompromised people can cause a life-threatening infection called invasive aspergillosis. Most commonly affects the lungs. For <i>Aspergillus</i> spp. demonstration, we use both classical techniques, such as direct microscoping of clinical samples, culture and demonstration of various cell components, as well as molecular techniques. Real-time polymerase chain reaction allows the quantification of fungal load in a clinical sample which gives us information on the burden or disease progression. In the study I compared two molecular methods PCR, commercially available kit MycAssay™ Aspergillus (Myconostica; Manchester, Great Britain) with the "in-house" method. The "in-house" method is cheaper and more affordable, and it has same sensitivity and specificity as the commercially available kit. Although molecular methods have high proportion of false negative results, those results can be complemented with the isolation of the fungus from the culture.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>II</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>III</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.2 NAMEN DELA .....	2
1.3 HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 KLASIFIKACIJA IN LASTNOSTI GLIV RODU <i>Aspergillus</i> .....	3
2.2 EPIDEMIOLOGIJA IN DEJAVNIKI TVEGANJA ZA NASTANEK OKUŽBE ....	4
2.3 PATOGENEZA IN VIRULENTNI DEJAVNIKI.....	6
<b>2.3.1. Sestava celične stene in njen vpliv na patogenezo okužbe.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.2. Odpornost glive na imunski sistem gostitelja .....</b>	<b>7</b>
2.4 OKUŽBE, KI JIH POVZROČAJO PLESNI <i>Aspergillus</i> spp.....	8
<b>2.4.1 Kolonizacija .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.1 Preobčutljivostne alergijske reakcije .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.2. Aspergilom .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.3. Invazivna aspergiloza.....</b>	<b>9</b>
2.5 ZDRAVLJENJE IN PREVENTIVA .....	10
2.6 MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA INVAZIVNE ASPERGILoze .....	11
<b>2.6.1 Neposredne tehnike.....</b>	<b>12</b>
<b>2.6.2 Kulture .....</b>	<b>13</b>
<b>2.6.3 Dokaz galaktomanana .....</b>	<b>13</b>
<b>2.6.4 (1→3)-β-D-glukan .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6.5 Molekularne tehnike .....</b>	<b>15</b>
2.6.5.1. Verižna reakcija s polimerazo .....	15
2.6.5.1.1 Specifičnost in občutljivost .....	16
2.6.5.1.1.1 Lažno pozitivni rezultati .....	17

2.6.5.1.1.2 Lažno negativni rezultati .....	18
2.6.5.1.1.3. Pozitivna in negativna napovedana vrednost testa .....	19
<b>3 METODE IN MATERIALI .....</b>	<b>21</b>
3.1 VZORCI.....	21
3.2 METODE.....	22
<b>3.2.1 Izolacija celokupne nukleinske kisline iz vzorcev spodnjih dihal.....</b>	<b>22</b>
3.2.1.1 Predpriprava vzorca.....	22
3.2.1.2 Izvedba avtomatske izolacije nukleinske kisline.....	22
<b>3.2.2 Pomnoževanje nukleinske kisline gliv .....</b>	<b>24</b>
3.2.2.1 Princip pomnoževanja nukleinske kisline s SmartCycler PCR .....	24
3.2.2.2 MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija)....	25
3.2.2.3 »In-house« PCR.....	28
<b>3.2.3 Določitev človeških zaviralcev PCR v realnem času v kliničnih vzorcih .....</b>	<b>29</b>
3.2.3.1 Določitev gena za β-globin z LightCycler (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind).....	30
3.3 STATISTIČNA ANALIZA .....	32
<b>3.3.1 Občutljivost.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.2 Specifičnost .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.3 Pozitivna napovedana vrednost .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.4 Negativna napovedana vrednost.....</b>	<b>32</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>33</b>
4.1 DOLOČANJE ANALITIČNE OBČUTLJIVOSTI DVEH PCR REAKCIJ Z <i>Aspergillus</i> ATCC 14110 V PRIMERJAVI S KULTURO .....	33
4.2 DOLOČANJE ANALITIČNE OBČUTLJIVOSTI DVEH PCR GLEDE NA REDČENO IZOLIRANO DNK .....	36
4.3 DOLOČANJE SPECIFIČNOSTI PCR .....	38
4.4 DOLOČANJE ANALITIČNE SPECIFIČNOSTI PCR .....	40
4.5 DOLOČANJE INHIBICIJE .....	43
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>45</b>
5.1 RAZPRAVA .....	45
5.2 SKLEPI .....	49

<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>50</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>51</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Klasifikacija <i>Aspergillus</i> spp. (Samson in Pitt, 2000) .....	4
<b>Preglednica 2:</b> Zabeleženi dejavniki tveganja za nastanek invazivne aspergiloze pred sprejemom na oddelek za intenzivno nego (OIN) in po bivanju na OIN v bolnišnici (Garnacho-Montero in sod., 2005) .....	5
<b>Preglednica 3:</b> Raztopine, ki se uporabljajo pri izvedbi testa s komercialno dostopnim kitom MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).....	26
<b>Preglednica 4:</b> Razmerje volumnov reagentov in DNK v reakcijski mešanici za izvedbo verižne reakcije s polimerazo v realnem času s kitom MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) .....	27
<b>Preglednica 5:</b> Temperaturni cikli pri pomnoževanju DNK z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času s kitom MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).....	27
<b>Preglednica 6:</b> Interpretacija rezultatov na podlagi števila ciklov pomnoževanja DNK pri vzorcu in interni kontroli .....	28
<b>Preglednica 7:</b> Sestava reakcijske mešanice pri »in-house« verižni reakciji s polimerazo v realnem času .....	29
<b>Preglednica 8:</b> Temperaturni cikli pri pomnoževanju nuleinske kisline z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času pri »in-house« metodi.....	29
<b>Preglednica 9:</b> Sestava reakcijske mešanice pri pomnoževanju gena za β-globin z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času v LightCycler sistemu (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind).....	31
<b>Preglednica 10:</b> Temperaturni cikli pri pomnoževanju gena za β-globin z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času v LightCycler sistemu (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind).....	31
<b>Preglednica 11:</b> Število zrastlih kolonij redčitvene vrste z vodo <i>Aspergillus</i> ATCC 14110 na Sabouraudovem gojišču (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija).....	34
<b>Preglednica 12:</b> Mejna vrednost (CT) pri pomnoževanju DNK izolirane iz različnih koncentracij aspergilusa v treh ponovitvah pri »in-house« testu. ....	34
<b>Preglednica 13:</b> Mejna vrednost (CT) pri pomnoževanju DNK izolirane iz različnih koncentracij aspergilusa v treh ponovitvah s kitom MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija). ....	35

---

<b>Preglednica 14:</b> Mejne vrednosti (CT) pri pomnoževanju redčene DNK izolirane iz koncentracije aspergilusa $10^6$ CFU/ml v treh ponovitvah pri » <i>in-house</i> « testu.....	36
<b>Preglednica 15:</b> Mejne vrednosti (CT) pri pomnoževanju redčene DNK izolirane iz koncentracije aspergilusa $10^6$ CFU/ml v treh ponovitvah s kitom MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija). .....	37
<b>Preglednica 16:</b> Rezultati kultivacije in molekularnih testov na vzorcih spodnjih dihal...	38
<b>Preglednica 17:</b> Rezultati testiranja vzorcev spodnjih dihal z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (PCR) pri » <i>in-house</i> « testu v primerjavi s kulturo. ....	39
<b>Preglednica 18:</b> Rezultati testiranja vzorcev spodnjih dihal z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (PCR) s kitom MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) v primerjavi s kulturo. ....	39
<b>Preglednica 19:</b> Prikaz pri dveh verižnih reakcijah s polimerazo v realnem času (PCR), kot opredelitev specifičnosti oligonukleotidnih začetnikov, izvedeni na kulturi različnih mikroorganizmov. ....	40
<b>Preglednica 20:</b> Število pozitivnih in negativnih ter lažno pozitivnih in negativnih rezultatov pri "in-house" testu verižne reakcije s polimerazo v realnem času (PCR) glede na kultivacijo 51 vzorcev spodnjih dihal.....	41
<b>Preglednica 21:</b> Število pozitivnih in negativnih ter lažno pozitivnih in negativnih rezultatov verižne reakcije s polimerazo v realnem času (PCR) s kitom MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) pri 51 vzorcih spodnjih dihal...	42
<b>Preglednica 22:</b> Primerjava rezultatov verižne reakcije s polimerazo v realnem času (PCR) z "in-house" metodo in s kitom MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija). .....	43
<b>Preglednica 23:</b> Primerjava pozitivnih rezultatov verižne reakcije s polimerazo v realnem času (PCR) v povezavi s številom CFU na kulturi Sabouraudovega gojišča (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija) pri vzorcih. ....	44

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Z elektronskim mikroskopom slikani deli za nespolno razmnoževanje <i>Aspergillus fumigatus</i> (Read in Jeffree, 1991). ....	3
<b>Slika 2:</b> Osamitev nukleinske kisline s tehnologijo magnetnih delcev (Kirchgesser in sod., 2003).....	23
<b>Slika 3:</b> Aparatura MagNa Pure Compact za avtomatsko izolacijo glivne DNK proizvajalca Roche (Roche, 2012).....	24
<b>Slika 4:</b> SmartCycler aparat z računalnikom, hladnim blokom in reakcijskim tubicami ter centrifugo (Cepheid, 2012).....	25
<b>Slika 5:</b> Grafični prikaz rezultatov PCR v realnem času pri »in-house« testu.....	34
<b>Slika 6:</b> Grafični prikaz rezultatov PCR v realnem času pri testu s kitom MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija). .....	35
<b>Slika 7:</b> Grafični prikaz rezultatov PCR v realnem času pri »in-house« testu.....	37
<b>Slika 8:</b> Grafični prikaz PCR v realnem času pri testu s kitom MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija). .....	38
<b>Slika 9:</b> Število pozitivnih rezultatov pri posamezni metodi od skupno 51 vzorcev spodnjih dihal. ....	39
<b>Slika 10:</b> Grafični prikaz rezultatov vzorcev dobljenih pri testu pomnoževanja gena za β-globin z apraturo LightCycler (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind).....	44

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BAL	bronhoalveolarni izpirek ( <i>angl.</i> Bronchoalveolar lavage)
bp	bazni pari
BLB	<i>angl.</i> Bacterial lysis buffer
CFU	<i>angl.</i> Colony forming units
CT	mejna vrednosti ( <i>angl.</i> Critical threshold)
DTT	<i>angl.</i> Dithiothreitol
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimski imunski test ( <i>angl.</i> Enzyme-linked immuno sorbent assay)
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti ( <i>angl.</i> Human immunodeficiency virus)
Ig	imunoglobulini
mtDNA	mitohondrijska deoksiribonukleinska kislina
NK	negativna kontrola
OIN	oddelek za intenzivno nego
PCR	reakcija z verižno polimerazo ( <i>angl.</i> Polymerase chain reaction)
PK	pozitivna kontrola
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina
TNF	tumor nekrotizantni dejavnik ( <i>angl.</i> Tumor necrosis factor)

## 1 UVOD

Glive rodu *Aspergillus* so oportunistične plesni, ki povzročajo širok spekter bolezni in stanj. Najpogosteji povzročitelj je *Aspergillus fumigatus*, sledijo mu *A. niger*, *A. flavus* in *A. terreus*. So ubikvitarne plesni, prav zaradi tega je tudi sama bolezen razširjena povsod po svetu; prisotne so v zemlji, na organskem materialu, spore pa najdemo v zraku in vodnih virih. Vrste rodu *Aspergillus* se ločijo po velikosti, obliki, teksturi in barvi nespolnih spor ali konidijev, ki ob sporulaciji preidejo v aerosol in dosežejo pljučne alveole. Omenjene glive hitro rastejo in imajo značilno strukturo. V zadnjih desetletjih se je pojavnost okužb z glivami znatno povečala, za kar je kriva naraščajoča populacija bolnikov s povečanim tveganjem za nastanek oportunističnih okužb. Temu pripomore tudi neprimerno ter neracionalno zdravljenje bolezni. (Mitchell, 2007; Latgé, 1999; Rementeria in sod., 2005; Warris in Verweij, 2005).

Ljudje z oslabelim imunskim sistemom so veliko bolj dovtetni za okužbe z *Aspergillus* spp., na katere so sicer zdravi ljudje odporni (Mitchell, 2007). Torej, plesen lahko kolonizira tudi dihala zdravih ljudi, največkrat pa so kolonizaciji in nastanku bolezni izpostavljeni ljudje s predhodnimi pljučnimi boleznimi (Latgé, 1999). Pomembnejši dejavniki tveganja za nastanek invazivne aspergiloze so nevtropenija pri kritično bolnih, bolniki okuženi s HIV (angl. Human immunodeficiency virus), ljudje po transplantaciji organov, s kronično obstruktivno pljučno boleznijo in zdravljenje s kortikosteroidi (Garnacho-Montero in sod., 2005). Vzrok je lahko v okvari mitetaličnega epitelija in aktivnosti alveolarnih makrofagov v dihalih ali okvarjeni funkciji nevtrofilnih granulocitov, kar vse služi primarni obrambi pred vdorom tujkov v pljuča. Plesni lahko kolonizirajo dihalno pot oziroma predhodno bolezensko nastale votline v pljučih, po preboleli tuberkulozi ali sarkidozi ali anatomske votlinah v obliki aspergiloma (Rementeria in sod., 2005). Incidenca pri transplantiranih bolnikih variira med 0,7 in 8,4 %, pri osebah z akutno levkemijo med 5 in 24 %, pri kronični granulomatni bolezni med 25 in 40 %, pri bolnikih s HIV znaša incidenca 12 % (Warris in Verweij, 2005). Pri bolniku z aspergilomom je najboljša rešitev odstranitev te strukture, nato pa zdravljenje z itrakonazolom in amfotericinom B. Za zdravljenje invazivne aspergiloze se uporablja amfotericin B in vorikonazol (Mitchell, 2007). Ugotovljeno je, da sta *A. terreus* in *A.*

*nidulans* že odporna proti amfotericinu B (Hope in sod., 2005). Alergijske oblike aspergiloze se zdravijo večinoma s kortikosteroidi. Bolniki, ki so izpostavljeni tveganju, da zbolijo za invazivno aspergilozu, prejemajo profilakso z amfotericinom B, itrakonazolom ali drugimi novejšimi antimikotiki (Mitchell, 2007). Terapijo pričnemo le na podlagi potrjene diagnoze bolezni, na osnovi histoloških in mikrobioloških izvidov biopsičnih vzorcev pljuč, ter prisotnosti galaktomananskega antiga na krvi bolnika. S tem ne le da zmanjšamo možnost razvoja odpornosti glive na terapijo, temveč tudi preprečimo nepotreben vnos toksičnih antimikotikov (Kawazu in sod., 2003). Za dokazovanje *Aspergillus* spp. se uporablajo tako klasične metode; neposredne tehnike, kultura, dokazovanje različnih komponent celic, kot tudi sodobne molekularne tehnike (Walsh in sod., 2008). Diagnostika, ki temelji na dokazovanju aspergilusa s pomočjo kulture, ima zelo nizko diagnostično občutljivost. Histopatološke analize so invazivne, imajo nizko občutljivost, sami rezultati pa nam ne povedo točno kateri rod ali vrsta je prisotna v določenem kliničnem vzorcu. Test z galaktomananom je bil do nedavnega zelo pogost test v dokazovanju invazivne aspergiloze, danes ga dopolnjujejo še molekularne metode – test verižne reakcije s polimerazo ali PCR (*angl.* Polimerase chain reaction), ki pa še niso standardizirane, pač pa se uporablajo v diagnostiki kot del raziskovalnega dela in razvoja teh metod (Khot in Fredricks, 2009; Walsh in sod., 2008).

## 1.2 NAMEN DELA

Namen dela je primerjava dveh testov PCR v realnem času za zaznavanje DNK gliv rodu *Aspergillus* iz kliničnih vzorcev spodnjih dihal, ugotoviti primerljivost metod, njihovo občutljivost in specifičnost ter možnost uporabe v rutinski diagnostiki glivičnih okužb.

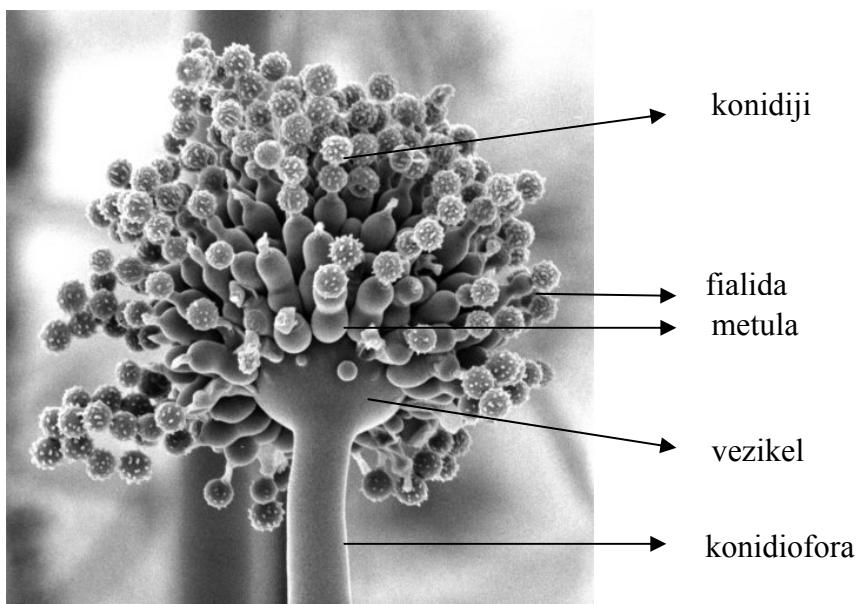
## 1.3 HIPOTEZE

Pri primerjavi “*in-house*” testa PCR v realnem času in komercialno dostopnega kita MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) za detekcijo *Aspergillus* spp. predvidevamo, da ne bomo dokazali razlik v zaznavanju gliv *Aspergillus* spp. v vzorcih spodnjih dihal.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KLASIFIKACIJA IN LASTNOSTI GLIV RODU *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* je bil prvič opisan leta 1729 (Mackenzie, 1988). Plesni imajo posebno strukturo, ki je sestavljena iz konidiofore, ki se razširi v vezikel ali mešiček, iz njega izhajajo fialide, metule in konidiji. Vrste rodu *Aspergillus* se ločijo po velikosti, obliki, teksturi in barvi konidijev. Kolonije so hitrorastoče, bele, rumene, rumeno-rjave, tudi črne ali zelenkaste barve. So plesni, ki izločajo majhne konidije, kateri preidejo v aerosol in se tako širijo po zraku (Mitchell, 2007). Konidiji izhajajo apikalno iz fialid. So enocelični, imajo gladko ali ornamentirano celično steno, lahko so prosojni ali pigmentirani, nanizani so v suhe verižice in tvorijo kompaktno stebričasto ali pahljačasto, razvezjano obliko nad oziroma okoli vezikla (Slika 1).



**Slika 1:** Z elektronskim mikroskopom slikani deli za nespolno razmnoževanje *Aspergillus fumigatus* (Read in Jeffree, 1991).

*Aspergillus fumigatus* je najbolj patogena vrsta tega rodu in je v več kot 90 % povzročitelj invazivne aspergiloze. Po načinu spolnega razmnoževanja ga uvrščamo v deblo *Ascomycota*, red *Eurotiales* in družino *Trichocomaceae* (Preglednica 1). Teleomorfi so *Eurotium*, *Emericella*, *Neosartorya* idr. (Samson in Pitt, 2000). Micelij sestavlja hialine

hife, ki so regularno septirane in se dihotomno cepijo. Iz njih izhajajo konidiofore v obliki nerazvejanega steba z apikalno zadebelitvijo, ki jo imenujemo vezikula ali mešiček. Fialide so stekleničaste oblike, lahko so nameščene direktno na veziklu ali pa na vmesnih podpornih celicah, ki jih imenujemo metule (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

**Preglednica 1:** Klasifikacija *Aspergillus* spp. (Samson in Pitt, 2000).

<b>Domena</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>Kraljestvo</b>	<i>Fungi</i>
<b>Deblo</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Poddeblo</b>	<i>Pezizomycotina</i>
<b>Razred</b>	<i>Eurotiomycetes</i>
<b>Red</b>	<i>Eurotiales</i>
<b>Družina</b>	<i>Trichocomaceae</i>
<b>Rod</b>	<i>Aspergillus</i>

## 2.2 EPIDEMIOLOGIJA IN DEJAVNIKI TVEGANJA ZA NASTANEK OKUŽBE

Glive rodu *Aspergillus* so ubikvitarne plesni, prav zaradi tega je tudi sama bolezen razširjena povsod po svetu (Mitchell, 2007). Nekatere vrste so človeški patogeni in povzročajo različna obolenja (Garnacho-Montero in sod., 2005). Najdemo jih na različnih substratih v tleh, na rastlinah in živalih (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002). Med najpogostejšimi povzročitelji je *Aspergillus fumigatus*, sledita mu *A. flavus* in *A. niger*. Te glive so odgovorne za nastanek številnih bolezni, od saprofitne kolonizacije do hitro razširjajoče se invazivne bolezni. Invazivna aspergiloza je glavni vzrok obolenosti in smrtnosti pri skrajno imunsko oslabljenih ljudeh; bolnikih z granulocitopenijo, s hematološkimi malignimi obolenji, po presaditvi organov in krvotvornih matičnih celic.

Prav iz tega razloga so izbruhi pogosti v bolnišnicah na intenzivni negi (Garnacho-Montero in sod., 2005).

Gernacho-Montero in sod. (2005) so izvedli nadzorno, opazovalno multicentrično študijo. Opredelili so glavne dejavnike tveganja za nastanek invazivne aspergiloze, ki so navedeni v Preglednici 2.

**Preglednica 2:** Zabeleženi dejavniki tveganja za nastanek invazivne aspergiloze pred sprejemom na oddelek za intenzivno nego (OIN) in po bivanju na OIN v bolnišnici (Garnacho-Montero in sod., 2005).

Dejavniki tveganja pred sprejemom v bolnišnico na OIN:	Dejavniki tveganja v času bivanja na OIN:
operacija pred sprejemom na OIN	prisotnost in trajanje prisotnosti vstavljenega katetra
sladkorna bolezen	erenteralno in parenteralno hranjenje
kronično obolenje jeter	mehanska ventilacija
odpoved ledvic	dializa
hematološka maligna obolenja	uporaba steroidov
maligna obolenja organov	nev tropenija
okužba s HIV	kemoterapija
nev tropenija	
imunosupresivnost	
presaditev organov	
terapije z obsevanjem	
kronična obstruktivna pljučna bolezen	

Raziskovalci so tako ugotovili, da so najpomembnejši dejavniki tveganja za nastanek invazivne aspergiloze nevtropenija pri kritično bolnih, kronična obstruktivna pljučna bolezen in zdravljenje s kortikosteroidi (Garnacho-Montero in sod., 2005).

## 2.3 PATOGENEZA IN VIRULENTNI DEJAVNIKI

Nekateri sevi *Aspergillus* spp. so patogeni zaradi izdelovanja toksičnih sekundarnih metabolitov (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002). Znanih je več virulentnih dejavnikov, ki omogočajo invazivnost. Gre za skupino molekul in genov, ki so vzrok za virulentnost sevov rodu *Aspergillus*. Nekateri geni in molekule sodelujejo pri izmikanju imunskega sistema bolnika, mednje sodi melanin-DHN. Prisotne imajo detoksifikacijske sisteme s katalazo (Cat1p in Cat2p) ter superoksid dismutazo (MnSOD). Pomembni virulentni dejavniki so tudi toksini (fumigaklavin C, aurasperon C, gliotoksin, helvolična kislina, fumagilin, Asp-hemolizin in ribotoksin), alergeni, proteaze, peptidaze in fosfolipaze. Koncentracija virulentnih dejavnikov po okužbi narašča do tolikšne mere, da lahko poškoduje celice in omogoči invazivno širjenje. Gliva ima sideroforje, s katerimi si pomaga pridobiti železo, prav tako poškodovanim celicam odvzame še fosfor in dušik. Nekateri geni se aktivirajo šele ob vstopu glive v telo, torej pri temperaturi 37 °C in še povečajo virulentnost aspergilusa (Rementeria in sod., 2005).

### 2.3.1. Sestava celične stene in njen vpliv na patogenezo okužbe

Celična stena *A. fumigatus* je zelo kompleksna struktura iz polisaharidov, kjer so prisotni številni antigeni. Nekatere komponente so neposredno povezane s kolonizacijo glive v gostitelju, druge pa so odgovorne za poškodbo tkiva pri kolonizaciji (Rementeria in sod., 2005).

Najobsežnejši delež celične stene predstavlja polisaharid, in sicer  $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glukan, na katerega se pripenjata tudi galaktomanan in hitin. Beta-(1→3)-glukan spodbudi aktivacijo komplementa in proizvodnjo vnetnih mediatorjev, kot so levkotrieni in tumor nekrotizirajoči dejavnik  $\alpha$  (angl. Tumor necrosis factor, TNF). V telesu se zadržuje dlje časa, saj ga fagociti zelo počasi razgradijo, medtem ko je pri mananu hitrejša razgradnja. Beta-(1→3)-glukan lahko uporabimo tudi v diagnostiki pri ljudeh s sumom na glivično okužbo. Sintezo omenjene molekule omogoča transmembranski proteinski kompleks glukan sintaza (Rementeria in sod., 2005).

Galaktomanan je prisoten v hifah in konidijih. V slednjih naj bi se bil sposoben zamenjati s sialično kislino in imel zmožnost vezave na fibronektin ter laminin v gostitelju.

Galaktomanan lahko zaznamo v supernatantu kulture, je molekula, ki se intenzivno sprošča ob invazivnem širjenju glive v tkivo; zaznamo ga v serumu, urinu in likvorju. Pri bolnikih z invazivno aspergilozo koncentracija galaktomanana variira. Pogosti diagnostični testi so aglutinacijski testi ter tehnika ELISA (*angl. Enzyme-linked immuno sorbent assay*), ki je občutljivejša od prvo navedene (Rementeria in sod., 2005).

Galaktomananski protein je sestavljen iz številnih aminokislin in iz vezavnega dela, ki omogoča pritrditev na membrano evkariontske celice. Obnaša se kot receptor za transport ionov in drugih hranil. Človek proizvaja protitelesa proti proteinu le v primeru, da je ta okužen s sevom *A. fumigatus* in je protein iz tega vidika uporaben v diagnostiki aspergiloma in invazivne aspergiloze. Izzove tudi nastanek protiteles - imunoglobulinov razreda A (IgA) na nosni sluznici, katera preprečijo prodiranje gliv v pljuča (Rementeria in sod., 2005).

Manoprotein je prav tako sestavni del celične stene in imunogena substanca, ki v človeškem telesu spodbudi proizvodnjo protiteles (Rementeria in sod., 2005).

V celični steni aspergilusa najdemo tudi hitin in hitinske sintaze (razreda od I do IV), ki vplivajo na količino hitina v miceliju in rast hife (Rementeria in sod., 2005).

### **2.3.2. Odpornost glive na imunski sistem gostitelja**

Konidiji so infektivni deli aspergilusa. Začetni korak okužbe predstavlja vdihovanje konidijev, ki pridejo do pljučnih alveolov in se vežejo s proteinimi na bazalno lamino. Zdravi ljudje imajo sposobnost popolnoma izločiti vdihane konidije, zaradi česar je okužba zelo redka v populaciji. Večina invazivnih okužb je prisotna pri imunsko oslabljenih ljudeh. Površina konidija naj bi bila v stalnem stiku z imunskim sistemom. Sledi germinacija, nastanek hif, ki prodirajo v bronhialno steno, žilne stene in se širijo po telesu s krvjo ter se razraščajo tudi v drugih organih. Gostitelj ima aktivne mehanizme za odstranitev tujkov, in sicer gibanje migetaličnega epitelija odstrani večino inhaliranih konidijev. Med obrambo gostitelja sodijo tudi alveolarni makrofagi, ki so zelo učinkoviti pri odstranjevanju konidijev in preprečevanju njihove germinacije. Sodelujejo tudi fagociti in komplement (Rementeria in sod., 2005).

Negativno nabiti ogljikovi hidrati na površini konidija imajo sposobnost vezave s fibronektinom in lamininom. Odkrili so tudi mutante, ki se vežejo na kolagen (Rementeria in sod., 2005).

Pigmenti, kot je melanin so tudi pomembni dejavniki virulence, saj omogočajo odpornost glive proti ultravijolični svetlobi, encimski lizi, oksidantom in ekstremnim temperaturam. V hifi *A. fumigatus* je prisotna zeleno-siva barva, ki povečuje zmožnost preživetja glive v okolju. Pigment melanin-1,8 dihidroksinaftalen (DHN-melanin) je vezan na celično steno konidija in je po okužbi v neposrednem stiku z imunskim odzivom gostitelja. Zaščiti glivo pred različnimi oksigenimi sistemi, ki jih uporablajo alveolarni makrofagi in fagociti za uničevanje tujkov. Sevi brez omenjenega pigmenta so veliko bolj dovetni za vodikov peroksid, natrijev hipoklorid, vsekakor pa so nagnjeni k temu, da jih makrofagi in fagociti hitreje uničijo. Ugotovili so tudi, da so konidiji *A. fumigatus* bolj patogeni, kot tisti pri *A. nidulans*, čeprav imata glivi podobno zgradbo, vzrok ni znan. Vodikov peroksid in superoksid naj bi bila tudi vključena pri uničevanju spor aspergilusa (Rementeria in sod., 2005).

Dandanes se precej raziskuje vpliv patogene glive na imunski odziv bolnika. Prisotnost molekul, ki so dokaj specifične za *Aspergillus* spp., in njihov genski zapis lahko uporabimo tudi v diagnostične namene, še posebej pri PCR-ju (Rementeria in sod., 2005).

#### 2.4 OKUŽBE, KI JIH POVZROČAJO PLESNI *Aspergillus* spp.

Ljudje z oslabljenim imunskim sistemom so veliko bolj dovetni za okužbe z *Aspergillus* spp., na katere so sicer zdravi ljudje ponavadi odporni (Mitchell, 2007). Torej, plesen lahko kolonizira tako dihala zdravih ljudi, največkrat pa so kolonizaciji izpostavljeni ljudje s predhodnimi pljučnimi boleznimi, kot je tuberkuloza, kronična obstruktivna pljučna bolezen ipd. (Latgé, 1999). Tip in potek mikoze je odvisen od osnovnih predispozicijskih lastnosti gostitelja, predvsem od imunskega stanja bolnika (Mitchell, 2007).

### **2.4.1 Kolonizacija**

Kolonizacijo z *Aspergillus* spp. definiramo pri bolnikih, ki imajo potrjeno izolacijo glive iz spodnjih dihal, nimajo drugih dejavnikov tveganja, značilne klinične slike ter radioloških znakov pljučnice (Mitchell, 2007; Simčič in Matos 2010).

#### **2.4.1 Preobčutljivostne alergijske reakcije**

Pri nekaterih ljudeh se zaradi vnosa konidijev v telo razvijejo preobčutljivostne alergijske reakcije proti antigenom le-teh. Človek začne proizvajati protitelesa IgE proti antigenom konidijev, kar lahko privede do astme. Alergijska bronhopulmonarna aspergiloza je preobčutljivostna bolezen pljuč, ki nastane najpogosteje pri atopikih, ki imajo značilne napade astme in periferne eozinofilije po vdihovanju spor *Aspergillus* spp. Poleg tega so zanjo značilni še pljučni infiltrati, kožna preobčutljivostna reakcija na antigene *Aspergillus* spp. in dvig specifičnih IgE ter IgG proti antigenom *Aspergillus* spp. (Matos, 2002). Dolgotrajna izpostavljenost manjšim količinam antiga vodi v nastanek pljučne fibrose, proksimalnih resorbcijskih atelektaz ali bronholoektazij. Ljudje, ki so masivno kronično izpostavljeni večjemu številu konidijev *Aspergillus* spp., lahko razvijejo ekstrinzični alergični alveolitis (Mitchell, 2007).

#### **2.4.2. Aspergilom**

Pri bolnikih z drugimi pljučnimi boleznimi, ki lahko zapuščajo spremenjeno anatomijo pljuč v obliki nastanka votlin in oslabljenega delovanja nespecifične obrambe, posebno alveolarnih makrofagov, se v teh lahko razraste kolonija *Aspergillus* spp. v obliki klopčastega micelija - aspergiloma, ki pecljato vrašča v steno votline. Aspergilom je lahko dolgo časa asimptomatski ali pa se kaže v obliki produktivnega kašlja, ki ga spremljajo hemoptize in oteženo dihanje. Masivna hemoptiza je redek a resen zaplet. *Aspergillus* spp. lahko tako kolonizira nosne sinuse, ušesni kanal, roženico in nohte (Mitchell, 2007).

#### **2.4.3. Invazivna aspergiloza**

Nevarna in življenje ogrožajoča bolezen je invazivna aspergiloza pri bolnikih z različnimi rakavimi obolenji, pri nevtropeničnih ljudeh in pri osebah po alogeni presaditvi

krvotvornih matičnih celic – ti bolniki spadajo v skupino z najvišjim tveganjem za nastanek invazivne aspergiloze (50-74 %) (De Pauw in sod., 2008; Latgé, 1999). V skupino bolnikov s srednjim tveganjem za nastanek invazivne aspergiloze, ki znaša od 10 do 30 %, sodijo bolniki po avtologni presaditvi krvotvornih matičnih celic, bolniki zdravljeni s kortikosteroidi, okuženi s HIV, bolniki z različnimi rakavimi obolenji, osebe po presaditvi čvrstih organov, podhranjeni in diabetiki. Pri teh bolnikih je zelo težko ovrednotiti pomen osamitve iz nesterilnih mest. Bolniki s cistično fibrozo in z boleznimi sistemsko vezivnih tkiv sodijo v skupino z nizko stopnjo tveganja za nastanek omenjene bolezni (Perfect in sod., 2001; Vandewoude in sod., 2006). Konidiji se tako po inhalaciji, pri skrajno imunsko oslabljenih bolnikih preoblikujejo v hife in prodirajo v pljuča ter druga tkiva. Pojavijo se simptomi kot so vročina, kašelj, oteženo dihanje in izkašljevanje krvi. Hife lahko poškodujejo stene krvnih žil, kar vodi v nastanek tromboze, infarktov ali celo nekroze tkiv, ki ga preskrbujejo poškodovane žile. Prav tako se lahko bolezen širi iz pljuč v gastrointestinalni trakt, ledvice, jetra, možgane in druge organe, kjer lahko nastanejo abscesi ter nekrotične lezije. Nujno je hitro in učinkovito zdravljenje, sicer je prognoza bolnikov z invazivno aspergilozo zelo slaba. Problem se pojavi pri bolnikih, ki nimajo takо izrazite bolezni in kliničnim znakom ne dajo velikega pomena. Pri teh se lahko razvije kronična nekrozantna pljučna aspergiloza, ki je blažja oblika invazivne aspergiloze (Mitchell, 2007).

Smrtnost zaradi invazivne aspergiloze je od 30 do 90 % pri nevtropeničnih ljudeh in je odvisna od samega imunskega stanja bolnika, mesta okužbe in načina zdravljenja (Francesconi in sod., 2006).

## 2.5 ZDRAVLJENJE IN PREVENTIVA

Aspergilom se zdravi v prvi vrsti s kirurško odstranitvijo te strukture, ki jo lahko podprejo še z antimikotiki, itrakonazolom, amfotericinom B ali vorokonazolom. Medtem, ko se pri bolnikih s kliničnimi znaki invazivne pljučne aspergiloze in osamitvijo *Aspergillus* spp. iz spodnjih dihal za zdravljenje uporabljata vorikonazol in amfotericin B. V primeru kolonizacije z *Aspergillus* spp., ki jo smatramo pri bolnikih s potrjeno izolacijo glive iz spodnjih dihal, ti ljudje nimajo drugih dejavnikov tveganja, značilne klinične slike in radioloških znakov pljučnice, je uvedba zdravljenja odvisna od klinične presoje lečečega

zdravnika (Mitchell, 2007; Simčič in Matos 2010). Kot je že znano, je amfotericin B zelo toksičen, vendar še zmeraj eden izmed najbolj uporabljenimi antimikotiki za težko potekajoče mikoze. Prav iz tega razloga je dobro, da pričnemo terapijo s tem zdravilom le na podlagi potrjene diagnoze bolezni s pomočjo patoloških in mikrobioloških pregledov vzorcev pljuč (Kawazu in sod., 2003). Na tržišču se že pojavljajo nove učinkovine, kot so triazoli, ki naj bi bili bolj učinkoviti pri zatiranju bolezni (Mitchell, 2007). Ugotovili so, da sta *A. terreus* in *A. nidulans* že odporna proti amfotericinu B (Hope in sod., 2005). Zadnje raziskave kažejo, da je nazadnje opisana gliva *A. lentulus* že odporna proti kar nekaj antimikotikom, vključno z azoli (Khot in Fredricks, 2009). Alergijske oblike aspergiloze se večinoma zdravijo s kortikosteroidi (Mitchell, 2007).

Ljudje, ki ob prisotnosti glive rodu *Aspergillus* razvijejo alergijske reakcije in močno imunsko oslabeli, ki imajo visoko tveganje za nastanek invazivne aspergiloze, se morajo izogibati stiku s konidiji glive. Zato tudi ljudi, ki se zdravijo s presaditvijo krvotvornih matičnih celic in so imunsko zelo oslabljeni, naselijo v prostore s posebnim prezračevalnim sistemom in posebnimi filtri. Prav tako se omeji število obiskov v bolnišnici in imajo tudi posebno poostren higiensko sanitarni režim v času regeneracije kostnega mozga. Nekateri bolniki, ki so izpostavljeni visokemu tveganju, da zbolijo za invazivno aspergilozo in pri katerih ne morejo zagotoviti zgoraj naštetih pogojev bivanjskega okolja, prejemajo preventivno zdravljenje z nizkimi dozami amfotericina B, itrakonazola ali katerega drugega od novejših triazolov ali ehinokandinov (Mitchell, 2007).

## 2.6 MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA INVAZIVNE ASPERGILoze

Evropska organizacija za raziskave in zdravljenje rakavih obolenj in Skupina za raziskave mikoz Nacionalnega inštituta za alergologijo in infekcijske bolezni sta določili merila za razvrščanje invazivnih glivičnih bolezni pri imunsko oslabljenih bolnikih z rakom in po presaditvi krvotvornih matičnih celic v dokazano, verjetno in možno invazivno glivično bolezen (De Pauw in sod., 2008).

Diagnoza je zelo težavna; temelji na podlagi lastnosti gostitelja, kliničnih in radioloških ugotovitvah ter mikoloških kriterijih (Fréale in sod., 2009). Prvi znak, ki pri bolniku nakazuje okužbo, je osamitev glive iz spodnjih dihal in je prva pomoč pri diagnozi bolezni

(Garnacho-Montero in sod., 2005; Vandewoude in sod., 2006; Latgé, 2001). Za učinkovito dokazovanje zgodnje invazivne aspergiloze se je izkazala tudi računalniška tomografija (Kawazu in sod., 2003). Občutljivost mikrobioloških orodij za zgodnje dokazovanje IA je trenutno še zelo nizka. Dokaz hif pri pregledu odvzetih sterilnih vzorcev, kot je biopsija pljuč, je nespoeren dokaz, ki potrdi diagnozo glivične okužbe, nadalje pa lahko z osamitvijo in identifikacijo opredelimo vrsto *Aspergillus* spp. ter temu primerno uvedemo zdravljenje (Fréale in sod., 2009). Pri osebah, ki so kritično bolne, pogosto težko uporabimo to metodo, ker so bolni zelo prizadeti, že deležni umetnega predihavanja ali imajo motnjo v strjevanju krvi in dobivajo inotropne učinkovine (Uffredi in sod., 2003). Pogosti vzorci za dokazovanje gliv rodu *Aspergillus* so sputum in biopsija tkiva pljuč. Hemokulture so se izkazale kot neuporabne, saj je rezultat redko utemeljeno pozitiven, saj je gliva prisotna v okolju in se lahko v vzorcu, iz predhodno sterilnih mest, znajde kot onesnaženje iz okolice (Mitchell, 2007). Serologija ni uporabna pri diagnozi aspergiloze, detekcija antigenov pa je omejena na nevtropenične bolnike (Garnacho-Montero in sod., 2005).

### **2.6.1 Neposredne tehnike**

Neposredne tehnike nam podajo prve informacije o prisotnosti glive in poteku bolezni. Poslužujemo se neposrednega mikroskopskega pregleda kliničnega vzorca. Pri tej metodi ne moremo razlikovati med glivami različnih rodov zaradi podobnosti v morfološki strukturi. Pojavnost razvejanih hif v tkivu kaže na invazivno rast glive v tkivo (Uffredi in sod., 2003; Latgé, 1999). Napovedana vrednost pozitivnega mikroskopskega razmaza je odvisna od kvalitete dobljenega vzorca; kvalitetnejše vzorce dobimo z invazivnimi postopki, kot so igelne biopsije in vzorci odvzeti ob bronhoskopiji. Slabše kvalitete sta nedvomno aspirat traheje in sputum. Vzorce ponavadi zelo težko odvzamemo ravno pri bolnikih, ki imajo največje tveganje za nastanek invazivne aspergiloze. Klinični vzorci s sumom na glivično okužbo so rutinsko obdelani z neposrednimi tehnikami, ki se med seboj razlikujejo glede na vrsto vzorca, stopnjo klinične nujnosti in laboratorij (Simčič in Matos, 2010). Vzorce lahko obdelamo z 10-20 % raztopino KOH, ki delno razgradi proteine v dobljenem vzorcu in poskrbi, da se preparat oziroma hife lepše prikažejo pod mikroskopom. Raztopina KOH ne prizadene hif (Mitchell, 2007; Simčič in Matos, 2010). Preparate lahko fiksiramo inobarvamo z različnimi barvili za barvanje po Gramu,

fluorescentnimi barvili, poznamo tudi barvanje citoloških preparatov in tkivnih rezin (Simčič in Matos, 2010).

### 2.6.2 Kulture

Gliva zelo dobro raste pri sobni temperaturi. Na večini gojišč zraste že v nekaj dneh. Rast je uspešna tudi na običajnih bakterioloških gojiščih, kot sta krvni in čokoladni agar. So plesni, človeku patogene in tako uspešno rastejo pri 37 °C. To je tudi lastnost po kateri lahko glive *Aspergillus* spp. uspešno ločimo od ostalih (za človeka) nepatogenih plesni. Mikološko gojišče prvočne izbire za identifikacijo je gojišče po Sabouraudu, kateremu so dodani antibiotiki, ki zavirajo rast morebitno prisotnih bakterij v vzorcu (Mitchell, 2007). Pogosto glivo identificiramo na podlagi morfologije kolonij in mikroskopskih značilnosti. Izgled kolonij je včasih zelo neznačilen, saj je aspergilus dober posnemovalec drugih plesnih, zato se lahko pri identifikaciji pojavi problem (Hope in sod., 2005; Mitchell, 2007). Poleg osamitve lahko uporabimo gojišča tudi za testiranje glive na občutljivost za antimikotike in tako pomagamo kliniku pri dokončni izbiri učinkovitega zdravila (Hope in sod., 2005). Slabost osamitve je dolgotrajnost postopka, saj je nujna vsaj 48 urna inkubacija vzorca, preden lahko dokončno identificiramo rod in vrsto. Prav tako pa se čas inkubacije lahko podaljša, če gliva počasi raste in slabo sporulira (Simčič in Matos, 2010). V teh primerih so za identifikacijo kulture plesni primernejše molekularne metode (Hope in sod., 2005).

### 2.6.3 Dokaz galaktomanana

Dokazovanje galaktomanana, ki je toplotno občutljiv polisaharid in se sprošča večinoma iz celične stene hif med rastjo v tkivu, je pomembna preiskava v diagnostiki, ne samo za *Aspergillus* spp., temveč tudi za nekatere druge glive kot so *Penicillium*, *Alternaria*, *Trychophyton*, *Wallemia* in *Cladosporium*. Prav zato se lahko pojavi težava z lažno pozitivnimi rezultati. Pogosto jih povzročajo glive *Penicillium* spp., saj v primerjavi z drugimi glivami, *Aspergillus* in *Penicillium* sproščata največ galaktomanana. Za dokaz galaktomanana uporabimo vzorce kot so serum, kri, likvor in urin (Stynen in sod., 1992; Swanink in sod., 1997). Pri testu se uporablja monoklonska protitelesa, ki prepoznajo stranske verige (1→5)- $\beta$ -D-galaktofuranoze molekule galaktomanana (Swanink in sod.,

1997). Galaktomanan se večinoma sprošča iz hif, deloma pa tudi iz konidijev *Aspergillus* spp. Njegovo določanje v bronchoalveolarnem izpirku (*angl. Bronchoalveolar lavage, BAL*) je zato lahko bolj smiselno za dokazovanje pljučne invazivne aspergiloze, kot s kulturo in dokazovanjem s PCR. Če bi potrdili okužbo s PCR ali osamili aspergilusa v kulturi iz BAL, ne smemo zavreči zelo velike možnosti, da lahko rezultat pomeni prisotnost konidijev v bolnikovem okolju ali pa kolonizacijo bolnikovih dihalnih poti. Iz tega razloga dopolnimo dokončno diagnozo z računalniško tomografijo visoke ločljivosti. Podatki raziskav nakazujejo, da je občutljivost testa na galaktomanan od 85 do 100 % (Becker in sod., 2003). Na lažno pozitivne rezultate vpliva tudi antibiotično zdravljenje. Terapiji s piperacilin tazobaktamom, amoksicilinom in amoksicilinom v kombinaciji s klavulansko kislino sledi onesnaženje z galaktomananom, saj so vsi produkt fermentacije *Penicillium* spp. Pri otrocih je večji delež lažno pozitivnih rezultatov zaradi kolonizacije prebavnega trakta z *Bifidobacterium* (Aquino in sod., 2007; Wheat in Walsh, 2008). Vzrok za lažno negativne rezultate je preventivna terapija z antimikotiki, ki delujejo proti *Aspergillus* spp. in posledično zmanjšujejo občutljivost testiranja v krvi (Marr in sod., 2005). Negativen rezultat še ne izključuje bolezni, prav tako pa tudi diagnoza ni gotova samo na podlagi enega pozitivnega izvida. Ugotovili so, da se antigenemija med zdravljenjem zmanjša, v nasprotnem primeru je zelo verjetno, da temu sledi slab izid bolezni, oziroma, da je okužba neobvladana in bi bilo zaželeno spremeniti zdravljenje (Woods in sod., 2007).

#### 2.6.4 (1→3)- $\beta$ -D-glukan

Molekula (1→3)- $\beta$ -D-glukan je polisaharid v celični steni nekaterih medicinsko pomembnih gliv. Dokaz te molekule se uporablja kot podpora za diagnozo verjetne invazivne glivične bolezni, kot je aspergiloza (Odabasi in sod., 2004). Raziskovalci navajajo, da ima test 100 % negativno napovedano vrednost in več kot 96 % specifičnost pri vsaj dveh zaporednih pozitivnih testih. Podatki o sami diagnostični točnosti testa v primeru invazivne pljučne aspergiloze znašajo za občutljivost od 55 do 100 % in za specifičnost testa od 52 do 100 % (Chamilos in Kontoyiannis, 2006). Občutljivost testa na (1→3)- $\beta$ -D-glukan ni odvisna od vrste aspergilusa (Hachem in sod., 2009). Možni so tudi lažno pozitivni rezultati, in sicer so jih zasledili pri bolnikih s sočasno po Gramu pozitivno bakterijsko okužbo, cirozo, celo po hemodializi s celuloznimi membranami, intravenoznem

prejetju plazemskih proteinov, po velikih odmerkih antibiotikov, zaradi bombažnih povojev in tudi vročinske kapi (Chamilos in Kontoyiannis, 2006; Wheat in Walsh, 2008).

### 2.6.5 Molekularne tehnike

Molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo je osnoval Kary Mullis s sodelavci leta 1984, in sicer v tistem času za zaznavanje infekcijskih dejavnikov, predvsem virusov. Ne glede na uspešnost PCR, se metoda splošno še ni prijela v detekciji patogenih gliv pri okužbah človeka. Že sama diagnoza okužb človeka s patogenimi glivami, tako ali drugače, predstavlja velik izziv. Vemo, da imajo radiološke slike, klasične mikrobiološke preiskave in histologija številne pomanjkljivosti, bodisi specifičnost, občutljivost ali pa trajanje postopka. Pogosto uporabljeni testi za dokazovanje galaktomanana in glukana velikokrat ne identificirajo vseh patogenih gliv, pojavi se tudi težava s specifičnostjo testa. Tehnika PCR ima svoje omejitve, in sicer lahko zazna le nekaj genov na posamezno reakcijo, s tem ko se tarčni geni pomnožijo v multiple kopije se lahko identificira dotičen organizem. Začetniki deoksiribonukleinske kisline (DNK) so lahko oblikovani tako, da je naša tarča identificirana do taksonomskega oziroma filogenetskega nivoja, to pomeni do rodu ali pa celo vrste (Khot in Fredricks, 2009).

Diagnostika invazivne aspergiloze z molekularnimi tehnikami, kot je PCR, je še v fazi raziskovanja. Zaradi hitrosti metode in zmožnosti določitve vrste *Aspergillus* spp. ter njihovih genov, tehnika teži k napredku v diagnostiki (Walsh in sod., 2008).

#### 2.6.5.1. Verižna reakcija s polimerazo

V dostopni literaturi je zabeleženo kar nekaj postopkov za dokazovanje invazivne aspergiloze s PCR, ki se med seboj razlikujejo po vrsti uporabljenega vzorca; lahko je to kri, serum ali plazma, po količini samega vzorca, načinu osamitve DNK, izbire tarčnega gena, zaznavanju produktov PCR in po uporabi kontrolnih vzorcev (Klingspor in sod., 2009). Nekaj kliničnih raziskav v diagnostiki invazivne aspergiloze kaže, da je test PCR s pomnoževanjem tarčnega gena za alkalno proteinazo in mitohondrijsko DNK (mtDNA), zaradi visoke specifičnosti in občutljivosti obetavna metoda v molekularni diagnostiki gliv (Raad in sod., 2002). Raziskave potrjujejo PCR s pomnoževanjem enega tarčnega gena 18S podenote ribosomske ribonukleinske kisline (rRNA) kot veliko boljšega za presajanje, saj je pri slednjem velika negativna napovedna vrednost (Halliday in sod., 2005). Verjetno je

pri validaciji PCR potrebno ločiti tako med testom za potrditev ali izključitev invazivne aspergiloze, kot tudi presajanje bolnikov z visokim tveganjem za nastanek bolezni in tistih, ki so brez znakov (Raad in sod., 2002). Raziskovalci so prišli do sklepov, da za izključevanje verjetne in dokazane invazivne aspergiloze zadostuje en sam negativen rezultat, za potrditev pa sta nujna dva zaporedno pozitivna rezultata omenjene molekularne metode. Tako znaša skupna občutljivost 75 % in skupna specifičnost 87 % (Mengoli in sod., 2009).

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času omogoči kvantifikacijo glivične obremenitve v kliničnem vzorcu, kar nam poda informacije o bremenu ali napredovanju bolezni. V nedavnih raziskavah, v katerih diagnoza glivičnih infekcij temelji na PCR, prevladuje PCR z reverzno transkriptazo. Poleg tega, lahko PCR v realnem času zagotovi hitro odkrivanje patogena in potrditev pri uporabi ciljno-taksonomskega testa s sondjo, ali pri uporabi metod, kot je PCR s širokim spektrom analize talilne krivulje pomnoženega produkta. Mnogokratni testi omogočijo hkratno odkrivanje številnih patogenov na različnih taksonomskih ravneh. Poleg tega lahko razlike v zaporedju produkta omogočijo točno identifikacijo do taksonomskega nivoja vrste. Na razvoj testov PCR za odkrivanje gliv vsekakor ni vplivalo pomanjkanje genomskeh informacij – le-teh je v današnjih časih dovolj in so zelo dostopne. Predvsem načrtovanje ustreznih poskusnih kontrol za PCR, je zaviralo razlago zgodnjih testov. Poleg tega je bila glavna ovira za boljšo diagnostično učinkovitost tudi izolacija DNK gliv iz kliničnih vzorcev. Diagnostika glivnih okužb s pomočjo PCR je v zadnjih desetih letih bistveno napredovala (Khot in Fredricks, 2009).

#### 2.6.5.1.1 Specifičnost in občutljivost

Pri testu je koristno določiti lažno pozitivne in lažno negativne rezultate, saj tako posledično določimo tudi specifičnost in občutljivost posameznega testa. Nujno je zagotoviti kvalitetno kontrolo pri meritvi produktov in optimizacijo metode, še posebej izbiro in količino kliničnega vzorca za izolacijo DNK, samo metodo izolacije DNK in model PCR analize. Definiran mora biti tudi tarčni gen, ki ga bomo pomnoževali. V zadnjih raziskavah so bile pogosto zabeležene visoke specifičnosti testov pri testu PCR in pri testu dokazovanja galaktomanana. Vrednost se je gibala med 80 in 100 % (Khot in Fredricks, 2009).

#### 2.6.5.1.1 Lažno pozitivni rezultati

Lažno pozitivne rezultate delimo na dva dela: lažno pozitivni rezultati postopka in klinični lažno pozitivni rezultati. V postopku so lažno pozitivni rezultati posledica kontaminacij iz okolja, morda predhodno pomnožen PCR produkt, navzkrižna reaktivnost začetnikov in sond z netarčnimi zaporedji drugih gliv ali morda celo drugimi organizmi. Torej, lažno pozitivnost postopka moramo nadzorovati s primernimi kontrolami. Lažna klinična pozitivnost je lahko posledica kolonizacije tkivnih površin, kjer so prisotne druge glice, ki ne izzovejo kliničnih znakov. Vsekakor ni kriva pomanjkljivost metode oziroma postopek, saj je le-ta pravilno odkril načrtovano stvar. V primeru, da imamo bolnika z visokim tveganjem za razvoj invazivne aspergiloze, bi bila prisotnost *Aspergillus* spp. v BAL ključnega pomena, saj lahko dokaže, ali gliva povzroča bolezen oziroma kakšne so možnosti za razvoj bolezni v prihodnosti (Khot in Fredricks, 2009).

Zabeleženo je, da so lahko kontaminacije vzrok lažno pozitivnih rezultatov, saj so spore gliv prisotne v okolju in zraku, zaradi česar obstaja velika možnost za kontaminacijo reagentov, ki jih uporabljam v PCR postopku, kar vpliva na višji delež lažno pozitivnih rezultatov. Težko pa je zmanjšati pojavnost kontaminacij, še posebej pri visoko občutljivih PCR metodah, ki zaznajo tako saprofite iz okolja kot človeške patogene glice, npr. *A. fumigatus*.

Do kontaminacij lahko pride pri različnih korakih v postopku testa:

- med vzorčenjem, rokovanjem ali shranjevanjem kliničnih vzorcev,
- pri izolaciji DNK; tako eksogeno iz okolja, kot endogeno iz reagentov uporabljenih pri izolaciji,
- med nastavtvami PCR postopka; eksogeno in endogeno,
- na katerikoli točki v postopku izvedbe testa, kot posledica prenosa okužbe iz predhodno pridobljenih produktov PCR v visoki koncentraciji,
- med izolacijo DNK in PCR lahko pride do navzkrižne kontaminacije, še posebej med vzorčenjem vzorcev z izjemno visoko ravnijo matrice DNK in z nastankom aerosola kontaminira bližnje reakcije (Khot in Fredricks, 2009).

Pravtako je lahko navzkrižna reaktivnost začetnikov in sond z netarčnimi glivami in človeško DNK vzrok za lažno pozitivne rezultate. Večina PCR testov je razvitih tako, da so visoko specifični za tarčni gen, prav tako pa mora biti navzkrižna reaktivnost z drugimi netarčnimi glivami ali človeško DNK natančno in pazljivo preučena. V študijah so natančno ocenili specifičnosti testov z drugimi netarčnimi glivami, medtem, ko je vpliv človeške DNK na funkcionalnost oligonukleotidnih začetnikov in sond v PCR testih zelo podcenjen. Človeška DNK lahko na različne načine vpliva na potek testa s PCR. Privede lahko do tvorbe nespecifičnih produktov ali pa do zaviranja obdelave tarčne glivne DNK. Pri testih PCR, kjer skušamo določiti glivno DNK, je dobro, če preprečimo navzkrižne reakcije s človeško DNK in tako zmanjšamo delež lažno pozitivnih rezultatov. Idealna diagnostika s testi PCR naj bi vključevala kontrolo pri izolaciji, ki bi kvantificirala človeško DNK za kontroliranje variabilnih spremenljivk, kot so določeni klinični vzorci (npr. BAL) ali stanje bolnika (Khot in Fredricks, 2009).

#### 2.6.5.1.1.2 Lažno negativni rezultati

Tehnologija PCR ima visoko analitično občutljivost, saj lahko zazna eno molekulo DNK. Za napredek in učinkovitost samega testa PCR morajo biti nove izboljšave narejene na nivoju ravnanja z vzorcem, izolaciji DNK in določitvi ciljnih koncentracij pred začetkom dela s PCR (Khot in Fredricks, 2009).

Za lažno negativne rezultate raziskovalci navajajo izolacijo DNK, ki jo zavira predvsem velik delež človeške DNK v kliničnem vzorcu, saj je volumen, ki ga uporabimo v reakciji zelo majhen, to pa posledično omejuje zaznavanje glivne DNK s PCR. Če sta v 1 ml krvi prisotna genom ali dva glivična organizma, je malo verjetno, da bi ju PCR zaznal, pa vendarle je tudi tako nizka koncentracija glivne DNK pomembna diagnostična informacija. Večina komercialno dostopnih kitov za izolacijo DNK uporabljenih v diagnostiki s PCR, je oblikovanih za lizo celic sesalcev ali celic gliv iz čiste kulture. Vemo, da je klinični vzorec običajno kombinacija le nekaj celic gliv oziroma njihove DNK ujete v večjem volumnu tkiva ali telesnih tekočin. Idealna izolacijska metoda bi imela visoke donose oziroma bi zagotovila minimalne izgube DNK in sposobnost koncentriranja glivne DNK, čeprav bi bilo v okolju prisotno ogromno človeške DNK. Poleg tega bi jo odlikovalo minimalno odstranjevanje inhibitorjev PCR in drugih reagentov, ki se vežejo na različne

kontaminante. Pri večini izolacijskih protokolov je v navadi obdelava kliničnega vzorca z encimom (zimolaza ali litikaza), ki povzroči razpad glivne celične stene. Ta korak mora biti nedvomno optimiziran, saj so encimi različno učinkoviti. Pri delovanju na celično steno njihove lastnosti variirajo predvsem glede na količino glukana, ki je pri vsaki glivi zastopan v drugačnem deležu celične stene. Za izolacijo DNK se uporablajo tako komercialno dostopni kiti kot tudi »*in-house*« metode. Zelo težko je določiti vpliv specifičnega tipa izolacije DNK in tehnike PCR na končni rezultat diagnoze, saj nanj vplivajo še drugi moteči dejavniki (Khot in Fredricks, 2009).

Lažno negativni rezultati so lahko posledica inhibicije v testu PCR. Če pride do zaviranja v delovanju testa PCR, se to odraža v povečanem številu lažno negativnih rezultatov. Idealni način za nadzor inhibicij je interna kontrola, ki se uporablja pri izvedbi testa PCR. Inhibitorji lahko močno zmanjšajo količino zaznane glivne DNK v reakciji s PCR, sočasno pa povečajo količino človeške DNK, ki je tako prisotna v visokih koncentracijah. Interna kontrola mora biti oblikovana tako, da je dovolj občutljiva, da lahko zazna že majhno stopnjo inhibicije v testu, le tako lahko vpliva na uspešnost in mejo zaznavanja PCR metode za dokazovanje gliv (Khot in Fredricks, 2009).

Nižja analitična občutljivost testa PCR lahko privede do lažno negativnih rezultatov. Trenutni glivni testi PCR za detekcijo genov v številnih kopijah, kot so rRNK operoni, imajo sposobnost doseči višek detekcije, kar znaša od enega do pet kopij na PCR. Število kopij rRNK operonov neke patogene glive je približno znan, vendar so pred kratkim dokazali, da je variabilnost v številu 18S rRNK podenote *A. fumigatus* odvisna od seva. Iz tega sledi, da se tudi meje zaznavnosti testa od seva do seva razlikujejo (Khot in Fredricks, 2009).

#### 2.6.5.1.1.3. Pozitivna in negativna napovedana vrednost testa

Pozitivna in negativna napovedna vrednost sta pomembni meri pri izvajaju testa PCR in odražata verjetnost točnosti testa. Meri sta odvisni tudi od prevalence, tj. od pogostosti bolezni. Prevalenca je definirana kot število okuženih ljudi v populaciji s številom vseh ljudi v populaciji (v določenem trenutku). Pozitivna napovedana vrednost pove, kolikšen delež bolnikov s pozitivnim rezultatom dejansko ima bolezen. Negativna napovedana

vrednost pa pove, kolikšen delež bolnikov z negativnim rezultatom diagnostičnega testa, dejansko nima bolezni (Khot in Fredricks, 2009).

Prav tako imajo vpliv na interpretacijo rezultatov testa PCR tudi drugi dejavniki. Optimizacija metode mora temeljiti na podlagi izbire kliničnega vzorca in primerne količine le-tega, da bomo imeli uporabne rezultate. Če večina DNK prosto kroži po vzorcu, bi bila smiselna metoda prvotne izbire ultrafiltracija, saj bi DNK tako lažje koncentrirali, kot pri sami izolaciji. Zabeleženo je, da je v BAL prisotnih več organizmov kot v krvi. Slednji vzorec je tudi lažje dobiti in z njim lahko dokažemo bolezen še preden dodobra izbruhne. Podatki v raziskavah nakazujejo na to, da ni razlike v pogostosti uporabe posameznega kliničnega vzorca za dokazovanje invazivne aspergiloze, obstaja le razlika v optimizaciji testa PCR in v količini kliničnega vzorca za analizo (Khot in Fredricks, 2009).

### 3 METODE IN MATERIALI

#### 3.1 VZORCI

Klinične vzorce, ki smo jih uporabili pri nalogi, smo zbirali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij (LAB GLI), in sicer od meseca marca 2010 do junija 2011. Gre za vzorce sputumov in aspiratov traheje, ki so bili po rutinski obdelavi v laboratoriju do analize shranjeni v hladilniku pri 4 °C. Ti vzorci so bili naključno izbrani. Preden smo dobili vzorce v obdelavo, so pri 33 od 51 vzorcev spodnjih dihal potrdili prisotnost glive *Aspergillus* spp. z rastjo na Sabouraudovem gojišču (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija). Pri identifikaciji gliv so upoštevali morfološki izgled kolonij na Sabouraudovem gojišču (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija) in mikroskopske značilnosti. Vzorce smo tako z rastjo na gojišču, kot tiste brez v nadaljevanju obdelali, izolirali DNK in dokazovali DNK *Aspergillus* spp. V vzorcih smo tudi ugotovljali prisotnost človeških zaviralcev reakcije PCR v realnem času.

Za določitev občutljivosti PCR reakcije smo uporabili homogeno pripravljeno suspenzijo kulture *Aspergillus* ATCC 14110 s koncentracijo  $10^6$  CFU/ml v vodi. Pripravili smo redčitveno vrsto do 1 CFU/ml, vzorce obdelali, izolirali DNK ter po obeh postopkih dokazovali DNK *Aspergillus* spp. Redčitveno vrsto smo preverjali tudi z rastjo na Sabouraudovem gojišču (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija). Za občutljivost obeh PCR-jev glede na izolirano in redčeno DNK, pa smo iz homogeno pripravljene suspenzije kulture *Aspergillus* ATCC 14110 s koncentracijo  $10^6$  CFU/ml v vodi izolirali DNK, jo redčili do koncentracije  $10^{-6}$  in nato pomnoževali DNK.

Za potrditev pravilne izbire oligonukleotidnih začetnikov pri »*in-house*« metodi smo uporabili izolirano DNK različnih mikroorganizmov; *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Propionibacterium* in *Bordetella parapertussis* ter izvedi PCR v realnem času. Pravtako smo preverili specifičnost oligonukleotidnih začetnikov tudi pri testu s kitom *Aspergillus*<sup>TM</sup> Myconostica (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Izolacija celokupne nukleinske kisline iz vzorcev spodnjih dihal

#### 3.2.1.1 Predpriprava vzorca

Vzorce, ki smo jih dobili v analizo smo predhodno obdelali po prilagojenem postopku Sanguinetti in sod. (2003):

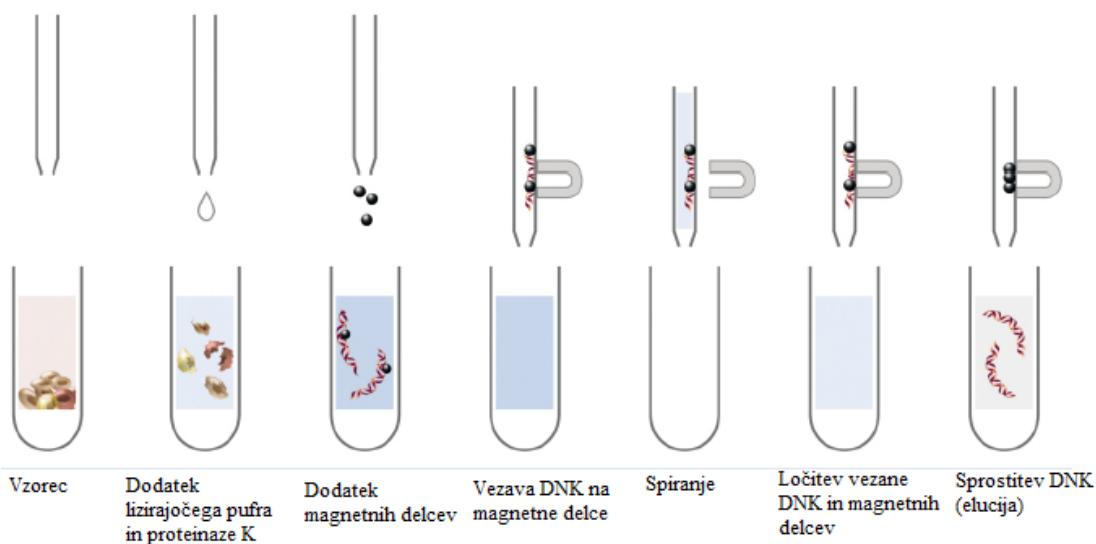
1. v epico smo odpipetirali približno 1 ml vzorca (tj. aspirat traheje, sputum);
2. dodali smo 125 µl 0,75 % DTT (*angl.* Dithiothreitol; Roche diagnostics, Indianapolis, ZDA) in vorteksirali;
3. vzorce smo nato inkubirali 30 minut pri 37 °C ter vmes večkrat premešali z vorteksiranjem;
4. vsebino smo prenesli v tubice s keramičnimi kroglicami (beatbeats, Roche, Basel, Švica) in stresali 2 minuti na MagNa Lyserju (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) pri maksimalni hitrosti;
5. vsebino (brez kroglic) smo prenesli v novo tubico in centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih/minuto;
6. supernatant smo odpipetirali, sedimentu pa dodali 180 µl BLB pufra (*angl.* Bacterial lysis buffer; Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) in 20 µl proteinaze K (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija);
7. inkubirali 30 minut pri 65 °C;
8. inkubirali 10 minut pri 95 °C;
9. inkubirali 5 minut pri 4 °C.

#### 3.2.1.2 Izvedba avtomatske izolacije nukleinske kisline

Sledila je izolacija glivne DNK s kitom MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit 1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija). Izolacija je potekala na aparatu MagNa Pure Compact (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) po protokolu DNA\_Bacteria, kjer je bil izhodni volumen vzorca 400 µl, končni volumen izolirane DNK pa 100 µl (Slika 2). Sistem omogoča sočasno avtomatizirano osamitev DNK iz osmih vzorcev, ki vključuje:

- ♦ lizo celic in beljakovin,

- vezavo DNK na magnetne delce,
- odstranitev primesi in inhibitorjev,
- elucijo vezane DNK pri visoki temperaturi.



**Slika 2:** Osamitev nukleinske kisline s tehnologijo magnetnih delcev (Kirchgesser in sod., 2003).

Prisotna DNA v vzorcu se veže na magnetne delce, ki so imobilizirani z biopolimeri, poroznim steklom ali sintetičnimi polimeri. Magnet, ki se nahaja izven tubice, omogoči nastanek magnetnega polja, proti kateremu se pomaknejo delci z vezano DNA. Tako pride do ločitve od vzorca.

V aparatu (Slika 3) smo vstavili kartuše z reagenti (proteinaza K, lizirajoči pufer, spiralni pufer, elucijski pufer in steklene kroglice z vezanimi magnetki), ki smo jih pred uporabo dobro pretresli, zaradi enakomerne porazdelitve magnetnih delcev. Pred pričetkom testa smo elucijskim epicam dodelili ustrezne protokolne številke vzorcev in skenirali njihove kode.

Izolirano DNA smo do nadaljnje analize shranili v hladilniku ( $4^{\circ}\text{C}$ ) oziroma v zamrzovalniku ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).



**Slika 3:** Aparatura MagNa Pure Compact za avtomatsko izolacijo glivne DNK proizvajalca Roche (Roche, 2012).

### 3.2.2 Pomnoževanje nukleinske kisline gliv

Verižna reakcija s polimerazo temelji na pomnoževanju specifičnih odsekov nukleinske kisline, pri katerem je pomembna izbira oligonukleotidnih začetnikov, ki ne smejo biti predolgi (20-28 nukleotidov) in z vsebnostjo 40-60 % nukleotidov gvanina in citozina. Pri posameznem oligonukleotidnem začetniku ne smejo biti prisotne komplementarne regije in prav tako ne na 3' koncu med izbranima paroma. Temperatura tališča med njima se ne sme razlikovati za več kot 5 °C (Mackay in sod., 2002).

#### 3.2.2.1 Princip pomnoževanja nukleinske kisline s SmartCycler PCR

SmartCycler aparat (Slika 4) je sposoben pomnoževati zaporedje nukleinskih kislin v realnem času in se uporablja v diagnostične namene, saj je avtomatiziran, ponovljiv in

natančen sistem. V eni reakcijski tubici lahko uporabimo več oligonukleotidnih začetnikov in fluorescentno označenih sond (delovanje temelji na TaqMan tehnologiji), zato lahko izvajamo tudi multiplex PCR. V vsako reakcijsko mesto vstavimo SmartCycler tubico volumna 25 µl. Tehnologija temelji na uporabi dveh oligonukleotidnih začetnikov ter fluorescentne sonde, ki se veže na njiju. Po uspešni vezavi na tarčo, polimeraza tekom pomnoževanja razreže vezano sondu in s tem loči vezano fluorescentno barvilo. Ta zasveti in odda signal, katerega jakost narašča tekom reakcije. Prisotnost produktov je vidna v povečani jakosti fluorescence, katere signal se pretvori v CT vrednost (Wortmann in sod., 2007). Emisijski signal zazna optični sistem z diodami CED, silikonskim fotodetektorjem in filtri z različnimi spektričnimi barvili. Ima štiri optične kanale, s katerih vsakič zbere podatke (Jothikumar in sod., 2009). Test s komercialno dostopnim kitom MycAssay<sup>TM</sup> *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) kot »in-house« test smo izvajali na t.i. aparaturi SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, Kanada).



**Slika 4:** SmartCycler aparat z računalnikom, hladnim blokom in reakcijskim tubicami ter centrifugo (Cepheid, 2012).

### 3.2.2.2 MycAssay<sup>TM</sup> *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija)

MycAssay<sup>TM</sup> *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) je komercialno dostopen molekularni diagnostični kit, ki se uporablja za zaznavanje genomske DNK

*Aspergillus* spp. iz vzorcev dihal. Pri tem se uporablja PCR tehnologija v realnem času. Mešanici reagentov dodamo vzorec. Test vključuje interno kontrolo, ki potrdi prisotnost zaviralnih substanc (DNK človeka, drugih bakterij in gliv) v preiskovanem vzorcu ter posledično potrdi funkcionalnost reagentov. Tarčna DNK se zazna z molekularnimi označevalci, ki so oligonukleotidne hibridizacijske sonde. Prisoten je tudi fluorofor, ki fluorescira pri določeni valovni dolžini in je kovalentno vezan na konec ene strani verige. Sonde ne svetijo le v primeru, da so v raztopini nevezane na verigo. Ko se veže na tarčno mesto na verigi nukleinske kisline, spremeni obliko; ločita se fluor in molekularni označevalci, kar omogoči nastanek fluorescence. Količina fluorescence v danem krogu ali pa po končanem testu, je odvisna od količine specifičnih pomnoženih produktov. Test PCR v realnem času sočasno zaznava količino fluorescence v reakcijski mešanici.

Postopki testa se izvajajo v ločenih prostorih tako, da ne pride do kontaminacije z aerosoli, kar je prednost testa PCR v realnem času. V Preglednici 3 so zabeležene štiri tubice vsaka z različnimi reagenti, ki jih v določeni količini (Preglednica 4) uporabimo pri PCR-ju. Potek PCR reakcije je opisan v Preglednici 5.

**Preglednica 3:** Raztopine, ki se uporabljajo pri izvedbi testa s komercialno dostopnim kitom MycAssay<sup>TM</sup> *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

Tubica 1	deoksiribonukleotidtrifosfat MgCl <sub>2</sub> raztopina DNK polimeraze	66 µl
Tubica 2	oligonukleotidni začetniki molekularni označevalci interna kontrola Tris-HCl pufer	66 µl
Tubica 3	negativna kontrola voda	25 µl
Tubica 4	pozitivna kontrola Tris-HCl pufer	25 µl

V interni kontroli je rekombinantni DNK plazmid, ki vsebuje zaporedje, ki ni sorodno tarčnemu zaporedju *Aspergillus* spp.

V pozitivni kontroli je plazmid, ki ima tarčno zaporedje *Aspergillus* spp.

**Preglednica 4:** Razmerje volumnov reagentov in DNK v reakcijski mešanici za izvedbo verižne reakcije s polimerazo v realnem času s kitom MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

Reagenti	Reakcija		
	Negativna kontrola	Vzorec bolnika	Pozitivna kontrola
Tubica 1	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl
Tubica 2	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl
Tubica 3	10 µl	-	-
Vzorec	-	10 µl	-
Tubica 4	-	-	10 µl
<b>Končni volumen reakcijske mešanice</b>	25 µl	25 µl	25 µl

**Preglednica 5:** Temperaturni cikli pri pomnoževanju DNK z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času s kitom MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

	Čas (s)	Temperatura (°C)	Število ciklov
Začetni aktivacijski korak	600	95	1
Denaturacija tarčne DNK	15	95	
Vezava začetnih oligonukleotidov	50	57	
Sinteza nove verige DNK	20	72	38

Po izvedenem testu PCR s komercialno dostopnim kitom rezultate interpretiramo na podlagi dobljenih CT posamezne kontrole in preiskovanega vzorca (Preglednica 6).

**Preglednica 6:** Interpretacija rezultatov na podlagi števila ciklov pomnoževanja DNK pri vzorcu in interni kontroli.

Vzorec	Število ciklov pri posameznem vzorcu	Število ciklov pri interni kontroli	Interpretacija	Rezultati
Negativna kontrola (NK)	> 37,0 ali nezaznano	27,7 - 31,9	sprejemljiva NK	veljavni rezultati
NK	> 37,0 ali nezaznano	< 27,7 ali > 31,9	napaka pri NK	ponoviti test
NK	< 37,0	27,7 - 31,9	kontaminacija	ponoviti test
Pozitivna kontrola (PK)	15,0 - 20,0	nezaznano	sprejemljiva PK	veljavni rezultati
PK	< 15,0 ali > 20,0	nezaznano	napaka pri PK	ponoviti test
Vzorec bolnika	> 33,5	27,7 - 31,9	negativen vzorec za <i>Aspergillus</i> spp	negativen
Vzorec bolnika	$\leq 33,5$	nezaznano	pozitiven vzorec za <i>Aspergillus</i> spp.	pozitiven
Vzorec bolnika	37,0 ali nezaznano	< 27,7 ali > 31,9	napaka IK v vzorcu, zaradi prisotnosti inhibitorjev testa	neveljavno

### 3.2.2.3 »In-house« PCR

Uporabili smo nekoliko spremenjen protokol raziskovalne ekipe Sanguinetti in sod. (2003); uporabili smo njihovo sondo in oligonukleotidne začetnike, medtem ko smo reakcijsko mešanico ter pogoje PCR reakcije sestavili sami.

Pri izvajajuju metode smo uporabili oligonukleotidna začetnika Asp-fwd: 5' - CCG ATT ACG TCC CTG CCC TT in Asp-rev: 5' - TTG ACC AAC TTT CCG GCT CTG, ki nalegata na zaporedje ohranjenih regij v velikosti 124 baznih parov (bp). Te regije se nahajajo na genu 18S rRNK, ki so enake nekaterim *Aspergillus* spp. (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. niger* in *A. terreus*). TaqMan sonda hibridizira dele med začetniki (5' – TCG GCC CTT AAA TAG CCC GGT CCG C) in je označena na 5' koncu s 6-karboksifluorescinom (FAM) in na 3' koncu s 6-karboksi-teremetil-rodamin (TAMRA). Začetniki in sonda so bili sintetizirani v podjetju Tibmol Biol (Berlin, Nemčija). V

Preglednici 7 so prikazane raztopine, ki smo jih uporabili pri »*in-house*« metodi, njihova začetna in končna koncentracija ter dodana količina k skupni reakcijski mešanici. Potek PCR reakcije je opisan v Preglednici 8.

**Preglednica 7:** Sestava reakcijske mešanice pri »*in-house*« verižni reakciji s polimerazo v realnem času.

Sestava reakcijske mešanice	Začetna koncentracija	Končna koncentracija	Količina
Oligonukleotidni začetniki	20 µM	0,2 µM	0,75 µl
Platinum-qPCR Supermix-UDG (Invitrogen; Carlsbad, USA)	12 X	1 X	12,5 µl
Voda	-	-	6,75 µl
Vzorec	-	-	5 µl
<b>Končni volumen reakcijske mešanice</b>	-	-	<b>25 µl</b>

**Preglednica 8:** Temperaturni cikli pri pomnoževanju nuleinske kisline z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času pri »*in-house*« metodi.

	Čas (s)	Temperatura (°C)	Število ciklov
Začetni aktivacijski korak	120	60	1
Denaturacija tarčne DNK	120	95	1
Vezava začetnih oligonukleotidov	15	95	
Sinteza nove verige DNK	60	61	45

### 3.2.3 Določitev človeških zaviralcev PCR v realnem času v kliničnih vzorcih

Vsak človek je skupek različnih okoljskih dejavnikov in genske zasnove, kar vpliva tako na zgradbo sluzi kot celic, ki so prisotne v kliničnem vzorcu za nadaljnje raziskave. Slednjo trditev smo zgolj informativno preverili z aparaturom LightCycler (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind), zaradi morebitnih zaviralcev reakcije PCR v realnem času. Določali smo gen za β-globin (Vrettou in sod., 2003).

### 3.2.3.1 Določitev gena za $\beta$ -globin z LightCycler (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind)

Sybr green v realnem času pomnožuje DNK v steklenih kapilarah, sočasno pa meri fluorescenco pomnožkov z uporabo prenosa fluorescentne energije. Sodelujeta dve lovki, in sicer prva je označena na 3' koncu s Cy5, druga pa na 5' koncu z barvilo SYBR. Ob vezavi lovke na pomnoženo DNK, Cy5 vzbudi aparat in energija, ki pri tem nastane se prenese na SYBR barvilo. Merimo količino fluorescence pomnožene DNK (Ellepola in Morrison, 2005). Lovka fluorescira le v primeru vezave na pomnoženo DNK. Fluorescensa se povečuje z vsakim krogom reakcije, kar lahko spremljamo preko računalnika (White in sod., 2003).

V aparaturi je potekal test za zaznavanje  $\beta$ -globina. Pri zaznavanju  $\beta$ -globina imamo pozitivno kontrolo, katere krivulja se dvigne na grafu pri določeni talilni temperaturi, ko se genski zapis za  $\beta$ -globin pomnoži. Če se človeški  $\beta$ -globin v vzorcu med testom pomnoži, je krivulja le-tega vzorca skladna s krivuljo pozitivne kontrole. V kolikor so prisotni zaviralcí, slednji onemogočijo pomnoževanje  $\beta$ -globina, česar posledica se kaže v odmaknjenosti krivulje vzorca od krivulje pozitivne kontrole (levo ali desno).

Oligonukleotidna začetnika KM29 (5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG-3') in RS42 (5'-GCTCACTCAGTGTGGCAAAG-3') omogočata pomnoževanje gena za humani  $\beta$ -globin v velikosti 536 bp. Molekularni test PCR v realnem času smo izvedli na računalniško vodenem sistemu LightCycler Instrument tip 1.5 (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind). Uporabili smo mešanico kemikalij iz kompleta LightCycler – FastStart DNA Master SYBER Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija). V Preglednici 9 so prikazane raztopine, ki smo jih uporabili pri pomnoževanju gena za  $\beta$ -globin, njihova začetna koncentracija in dodana količina k skupni reakcijski mešanici. Potek PCR reakcije je opisan v Preglednici 10.

**Preglednica 9:** Sestava reakcijske mešanice pri pomnoževanju gena za  $\beta$ -globin z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času v LightCycler sistemu (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind).

Sestava reakcijske mešanice	Začetna koncentracija	Količina
LightCycler – FastStart DNA Master SYBER Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija)	-	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,4 $\mu$ l
Oligonukleotidni začetnik RS42	50 $\mu$ M	0,1 $\mu$ l
Oligonukleotidni začetnik KM29	50 $\mu$ M	0,1 $\mu$ l
Voda	-	10,4 $\mu$ l
Vzorec	-	5 $\mu$ l
<b>Končni volumen reakcijske mešanice</b>	-	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

**Preglednica 10:** Temperaturni cikli pri pomnoževanju gena za  $\beta$ -globin z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času v LightCycler sistemu (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind).

	Čas (s)	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Število ciklov
<b>Začetni aktivacijski korak</b>	600	95	1
<b>Denaturacija tarčne DNK</b>	15	95	
<b>Vezava začetnih oligonukleotidov</b>	4	69	45
<b>Sinteza nove verige DNK</b>	10	72	

Beta-globin pozitivne vzorce smo določili na podlagi vrednosti Tm pozitivne kontrole 88-89  $^{\circ}$ C. Vsi vzorci, katerih Tm je odstopal od Tm pozitivne kontrole, so imeli prisotne

zaviralce reakcije PCR v realnem času, saj je iz grafa razvidno, da se gen za  $\beta$ -globin ni pomnožil.

### 3.3 STATISTIČNA ANALIZA

#### 3.3.1 Občutljivost

Občutljivost posameznega diagnostičnega testa izračunamo tako, da delimo število pozitivnih rezultatov z vsoto pozitivnih in lažno negativnih rezultatov (Gordis, 2004).

#### 3.3.2 Specifičnost

Specifičnost je sposobnost testa, da pravilno identificira tiste osebe, ki nimajo bolezni in je izražena s številom negativnih rezultatov deljenih z vsoto negativnih in lažno pozitivnih rezultatov (Gordis, 2004).

#### 3.3.3 Pozitivna napovedana vrednost

Pozitivna napovedana vrednost testa pove kolikšen delež bolnikov s pozitivnim rezultatom ima bolezen. Definirana je kot število pozitivnih rezultatov deljeno z vsoto pozitivnih in lažno pozitivnih (Gordis, 2004).

#### 3.3.4 Negativna napovedana vrednost

Negativna napovedana vrednost testa pove kolikšna je verjetnost, če je test negativen, da bolnik nima bolezni. Definirana je kot število negativnih deljeno z vsoto in lažno negativnimi rezultati (Gordis, 2004).

## 4 REZULTATI

Glede na namen dela, ki je bil primerjava dveh metod pomnoževanja DNK *Aspergillus* spp., smo predhodno določili občutljivost PCR v realnem času na različne načine tako z »*in-house*« metodo kot z MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

### 4.1 DOLOČANJE ANALITIČNE OBČUTLJIVOSTI DVEH PCR REAKCIJ Z *Aspergillus* ATCC 14110 V PRIMERJAVI S KULTURO

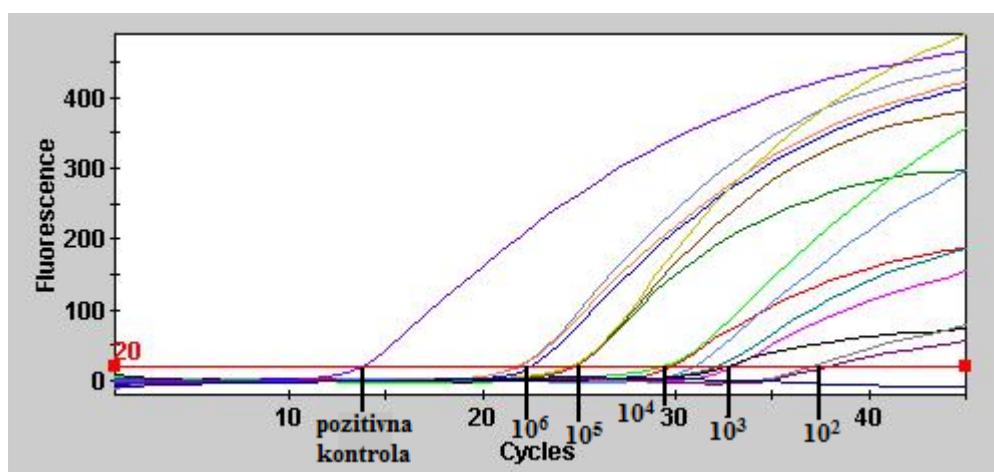
Pripravili smo homogeno suspenzijo kulture *Aspergillus* ATCC 14110 s koncentracijo  $10^6$  CFU/ml in naredili redčitveno vrsto z vodo s koncentracijami  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ , 5, 2'5,  $10^0$  CFU/ml. Ustreznost redčitvene vrste smo preverili z nacepitvijo na Sabouraudovo gojišče (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija) 100 µl posamezne redčitve in štetjem zrastlih kolonij (Preglednica 11). Določanje občutljivosti PCR reakcije *Aspergillus* ATCC 14110 smo izvedli z izolacijo DNK iz redčitvene vrste kulture z vodo po zgoraj omenjenem protokolu. Pomnoževali smo DNK s komercialno dostopnim kitom MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) in z »*in-house*« metodo. V Preglednici 12 so dobljeni rezultati PCR v realnem času pri »*in-house*« testu, ki so tudi grafično prikazani na Sliki 5, ki prikazuje CT DNK izolirane iz pripravljenih redčitvenih vzorcev od  $10^6$  do  $10^0$  CFU/ml. Vsaka posamezna krivulja predstavlja pomnoženo DNK *Aspergillus* ATCC 14110 izolirano iz koncentracije od  $10^6$  do  $10^2$  CFU/ml.

**Preglednica 11:** Število zrastlih kolonij redčitvene vrste z vodo *Aspergillus* ATCC 14110 na Sabouraudovem gojišču (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija).

Redčitev	Število zrastlih kolonij
$10^6$	neštevno
$10^5$	neštevno
$10^4$	896
$10^3$	94
$10^2$	11
$10^1$	1
< $10^1$	0

**Preglednica 12:** Mejna vrednost (CT) pri pomnoževanju DNK izolirane iz različnih koncentracij aspergilusa v treh ponovitvah pri »in-house« testu.

	$10^6$ CT	povprečje	$10^5$ CT	povprečje	$10^4$ CT	povprečje	$10^3$ CT	povprečje	$10^2$ CT	povprečje
1	22,5		1	24,7	1	29,8	1	32,2	1	37,1
2	21,9	22,1	2	24,5	2	29,3	2	33,1	2	37,8
3	21,8		3	24,7	3	30,9	3	32,6	3	-
% pozitivnih rezultatov	100 % (3/3)		100 % (3/3)		100 % (3/3)		100 % (3/3)		67 % (2/3)	



**Slika 5:** Grafični prikaz rezultatov PCR v realnem času pri »in-house« testu.

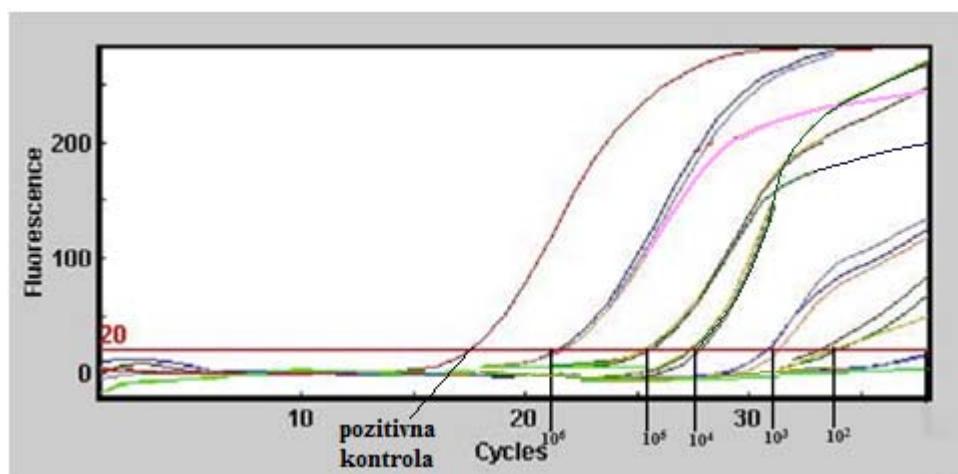
Pri redčitvah od  $10^1$  do  $10^0$  so bili vsi rezultati negativni.

Glede na redčitev vzorca je bila PCR reakcija pozitivna v poznejšem času. Mejna vrednost se je zviševala (Preglednica 12) sorazmerno s številom kolonij *Aspergillus* na Sabouraoudovem gojišču (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija) (Preglednica 11).

V Preglednici 13 so dobljeni rezultati PCR v realnem času pri testu s kitom MycAssay<sup>TM</sup> *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija), ki so tudi grafično prikazani na Sliki 6, ki prikazuje CT DNK izolirane iz redčitvene vrste suspenzije aspergilusa koncentracij od  $10^6$  do  $10^0$  CFU/ml. Vsaka posamezna krivulja predstavlja pomnoženo DNK *Aspergillus* ATCC 14110 izolirano iz koncentracije od  $10^6$  do  $10^2$  CFU/ml.

**Preglednica 13:** Mejna vrednost (CT) pri pomnoževanju DNK izolirane iz različnih koncentracij aspergilusa v treh ponovitvah s kitom MycAssay<sup>TM</sup> *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

$10^6$ CT	povprečje	$10^5$ CT	povprečje	$10^4$ CT	povprečje	$10^3$ CT	povprečje	$10^2$ CT	povprečje
1 20,9		1 24,7		1 27,4		1 30,7		1 34,0	
2 21,1	21,0	2 24,7	24,8	2 27,3	27,5	2 30,8	30,9	2 33,7	33,6
3 21,0		3 24,9		3 27,8		3 31,3		3 33,1	
% pozitivnih rezultatov	100 % (3/3)		100 % (3/3)		100 % (3/3)		100 % (3/3)		100 % (3/3)



**Slika 6:** Grafični prikaz rezultatov PCR v realnem času pri testu s kitom MycAssay<sup>TM</sup> *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

Pri redčitvah od  $10^1$  do  $10^0$  so bili vsi rezultati negativni.

Glede na redčitev vzorca je bila PCR reakcija pozitivna v poznejšem času. Mejna vrednost se je zviševala (Preglednica 13) sorazmerno s številom kolonij *Aspergillus* na Sabouraudovem gojišču (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija) (Preglednica 11).

Pri rezultatih dobljenih s PCR v realnem času, tako z »*in-house*« metodo kot s kitom MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija), nismo našli statistično značilnih razlik. Rezultati obeh molekularnih testov pravtako sovpadajo s številom zrastlih kolonij na Sabouraudovem gojišču (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija).

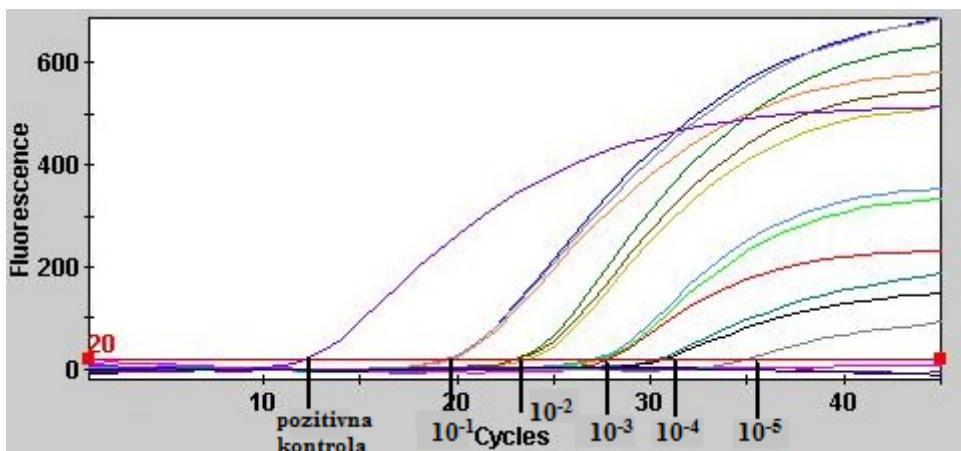
#### 4.2 DOLOČANJE ANALITIČNE OBČUTLJIVOSTI DVEH PCR GLEDE NA REDČENO IZOLIRANO DNK

Drugi način določanja ovčutljivosti PCR smo izvedli na izolirani DNK *Aspergillus* ATCC 14110. Pripravili smo homogeno suspenzijo kulture *Aspergillus* ATCC 14110 s koncentracijo  $10^6$  CFU/ml. Izolirali smo DNK po zgoraj omenjenem protokolu in iz te DNK pripravili redčitveno vrsto z vodo  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6,5}$ ,  $10^{-6,75}$  in  $10^{-7}$ . Vzorce smo pomnoževali z »*in-house*« metodo in s kitom MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

V Preglednici 14 so dobljeni rezultati PCR v realnem času pri »*in-house*« testu, ki so tudi grafično prikazani na Sliki 7. Na Sliki 7 posamezna krivulja predstavlja pomnoženo DNK, različnih izhodiščnih koncentracij od  $10^{-1}$  do  $10^{-7}$ . Pri redčitvah od  $10^{-6}$  do  $10^{-7}$  so bili vsi rezultati negativni.

**Preglednica 14:** Mejne vrednosti (CT) pri pomnoževanju redčene DNK izolirane iz koncentracije aspergilusa  $10^6$  CFU/ml v treh ponovitvah pri »*in-house*« testu.

$10^{-1}$ CT	povprečje	$10^{-2}$ CT	povprečje	$10^{-3}$ CT	povprečje	$10^{-4}$ CT	povprečje	$10^{-5}$ CT	povprečje
1 19,5	19,5	1 23,1	23,3	1 27,8	27,5	1 30,3	30,5	1 34,9	34,9
2 19,4		2 23,6		2 27,5		2 30,7		2 -	
3 19,6		3 23,2		3 27,2		3 -		3 -	
% pozitivnih rezultatov	100 % (3/3)		100 % (3/3)		100 % (3/3)		67 % (2/3)		33 % (1/3)



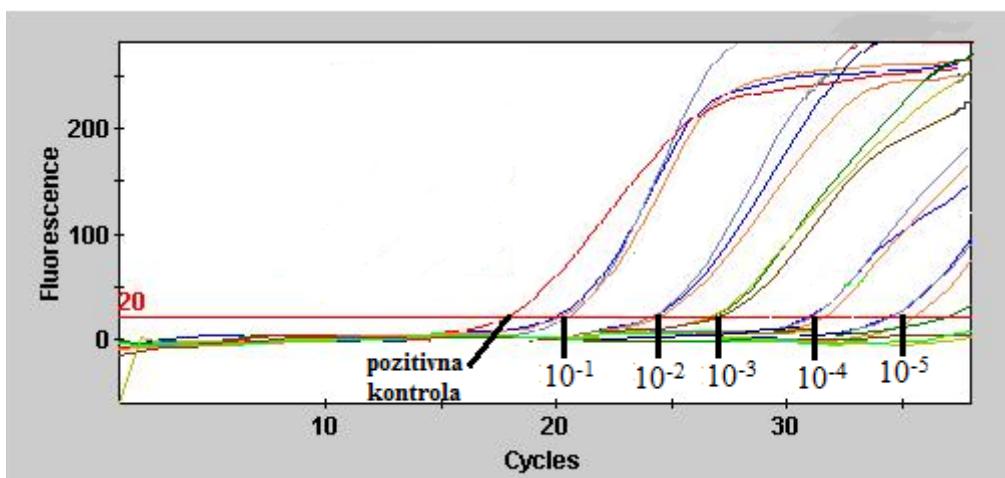
Slika 7: Grafični prikaz rezultatov PCR v realnem času pri »in-house« testu.

Tako Preglednica 14 kot Slika 7 kažeta, da se z redčenjem vzorca izolirane DNK povečuje CT. PCR reakcija je pozitivna v poznejšem času pri »in-house« testu.

V Preglednici 15 so dobljeni rezultati PCR v realnem času pri testu s kitom MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija), ki so tudi grafično prikazani na Sliki 8. Na Sliki 8 posamezna krivulja predstavlja pomnoženo DNK, različnih izhodiščnih koncentracij od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-7</sup>. Pri redčitvah od 10<sup>-6</sup> do 10<sup>-7</sup> so bili vsi rezultati negativni.

**Preglednica 15:** Mejne vrednosti (CT) pri pomnoževanju redčene DNK izolirane iz koncentracije aspergilusa 10<sup>6</sup> CFU/ml v treh ponovitvah s kitom MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

10 <sup>-1</sup> CT	povprečje	10 <sup>-2</sup> CT	povprečje	10 <sup>-3</sup> CT	povprečje	10 <sup>-4</sup> CT	povprečje	10 <sup>-5</sup> CT	povprečje
1 20,4	20,6	1 24,7	24,8	1 27,3	27,4	1 31,1	31,3	1 34,4	34,4
2 20,9		2 24,6		2 27,2		2 31,2		2 34,4	
3 20,6		3 25		3 27,6		3 31,7		3 35,4	
% pozitivnih rezultatov	100 % (3/3)		100 % (3/3)		100 % (3/3)		100 % (3/3)		100 % (3/3)



**Slika 8:** Grafični prikaz PCR v realnem času pri testu s kitom MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

Tako Preglednica 15 kot Slika 8 kažeta, da se z redčenjem vzorca izolirane DNK povečuje CT. PCR reakcija je pozitivna v poznejšem času pri MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

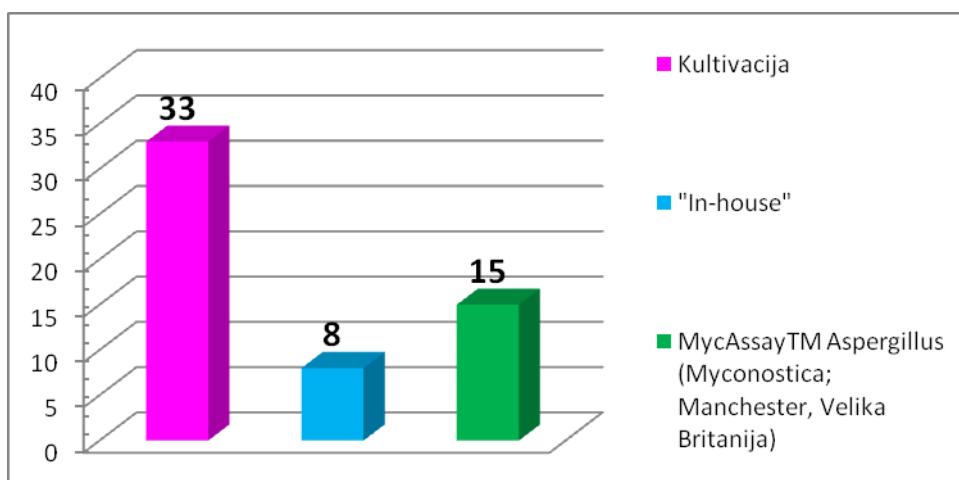
Pri redčenju izolirane DNK z vodo in pri primerjavi obeh molekularnih testih ni statistično značilnih razlik.

#### 4.3 DOLOČANJE SPECIFIČNOSTI PCR

Uporabili smo 51 vzorcev spodnjih dihal. Specifičnost PCR smo določili s sovpadanjem pozitivnih kultur in obeh molekularnih metod pri vzorcih spodnjih dihal. Od vseh je bilo 33 pozitivnih s kulturo, 8 z »in-house« testom in 15 z MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija), kar je prikazano v preglednici 16 in s Sliko 9.

**Preglednica 16:** Rezultati kultivacije in molekularnih testov na vzorcih spodnjih dihal.

Vzorec	Kultivacija	»In-house« PCR	MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus PCR (Myconostica; Manchester, Velika Britanija)
<b>Pozitivni</b>	65 % (33/51)	16 % (8/51)	29 % (15/51)
<b>Negativni</b>	35 % (18/51)	84 % (43/51)	71 % (36/51)



**Slika 9:** Število pozitivnih rezultatov pri posamezni metodi od skupno 51 vzorcev spodnjih dihal.

Iz Slike 9 je vidno, da sta obe molekularni metodi slabši od kultivacije.

Preglednici 17 in 18 prikazujeta rezultate posamezne PCR reakcije v primerjavi s kulturo pri vzorcih spodnjih dihal.

**Preglednica 17:** Rezultati testiranja vzorcev spodnjih dihal z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (PCR) pri »*in-house*« testu v primerjavi s kulturo.

Izidi »in-house« PCR	Kultura		Vsota
	Pozitivna	Negativna	
Pozitivni	8	0	8
Negativni	25	18	43
Vsota	33	18	51

**Preglednica 18:** Rezultati testiranja vzorcev spodnjih dihal z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (PCR) s kitom MycAssay™ Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) v primerjavi s kulturo.

Izidi MycAssay™ Aspergillus PCR (Myconostica; Manchester, Velika Britanija)	Kultura		Vsota
	Pozitivna	Negativna	
Pozitivni	15	0	15
Negativni	18	18	36
Vsota	33	18	51

#### 4.4 DOLOČANJE ANALITIČNE SPECIFIČNOSTI PCR

Specifičnost PCR smo potrdili tako, da smo določili specifičnost oligonukleotidnih začetnikov z DNK različnih mikroorganizmov (Preglednica 19). Rezultati so pokazali, da so izbrani oligonukleotidni začetniki specifični za *Aspergillus* spp.

**Preglednica 19:** Prikaz pri dveh verižnih reakcijah s polimerazo v realnem času (PCR), kot opredelitev specifičnosti oligonukleotidnih začetnikov, izvedeni na kulturi različnih mikroorganizmov.

Referenčni sev	»In-house« PCR	MycAssay™ <i>Aspergillus</i> PCR (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	negativno	negativno
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	negativno	negativno
<i>Escherichia coli</i> NCTC 3476	negativno	negativno
<i>Klebsiella</i> ATCC BAA 1705	negativno	negativno
<i>Propionibacterium</i> NEQAS 9331	negativno	negativno
<i>Bordetella parapertussis</i> NEQAS 1861	negativno	negativno

Iz vseh zgoraj dobljenih rezultatov smo izračunali klinično občutljivost in specifičnost obeh molekularnih testov (Preglednica 20 in 21).

**Preglednica 20:** Število pozitivnih in negativnih ter lažno pozitivnih in negativnih rezultatov pri "in-house" testu verižne reakcije s polimerazo v realnem času (PCR) glede na kultivacijo 51 vzorcev spodnjih dihal.

»In-house« PCR	Izid testa (število rezultatov)
Resnično pozitivni	8
Lažno pozitivni	0
Resnično negativni	18
Lažno negativni	25
<b>OBČUTLJIVOST</b>	<b>31 %</b>
<b>SPECIFIČNOST</b>	<b>100 %</b>

$$\text{Občutljivost »in-house« testa} = \frac{8}{8 + 18} * 100 \% = 30,8 \%$$

$$\text{Specifičnost »in-house« testa} = \frac{8}{8 + 0} * 100 \% = 100 \%$$

$$\text{Pozitivna napovedana vrednost »in-house« testa} = \frac{8}{8 + 0} * 100 \% = 100 \%$$

$$\text{Negativna napovedana vrednost »in-house« testa} = \frac{18}{18 + 25} * 100 \% = 41,9 \%$$

**Preglednica 21:** Število pozitivnih in negativnih ter lažno pozitivnih in negativnih rezultatov verižne reakcije s polimerazo v realnem času (PCR) s kitom MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) pri 51 vzorcih spodnjih dihal.

<b>MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus PCR</b> (Myconostica; Manchester, Velika Britanija)	Izid testa (število rezultatov)
Resnično pozitivni	15
Lažno pozitivni	0
Resnično negativni	18
Lažno negativni	18
<b>OBČUTLJIVOST</b>	<b>36 %</b>
<b>SPECIFIČNOST</b>	<b>100 %</b>

Občutljivost MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus testa (Myconostica; Manchester, Velika Britanija)

$$= \frac{15}{15 + 18} * 100 \% = 36,3 \%$$

Specifičnost MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus testa (Myconostica; Manchester, Velika Britanija)

$$= \frac{18}{18 + 0} * 100 \% = 100 \%$$

Pozitivna napovedana vrednost MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus testa (Myconostica; Manchester,

$$\text{Velika Britanija}) = \frac{15}{15 + 0} * 100 \% = 100 \%$$

Negativna napovedana vrednost MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus testa (Myconostica; Manchester,

$$\text{Velika Britanija}) = \frac{18}{10 + 18} * 100 \% = 50 \%$$

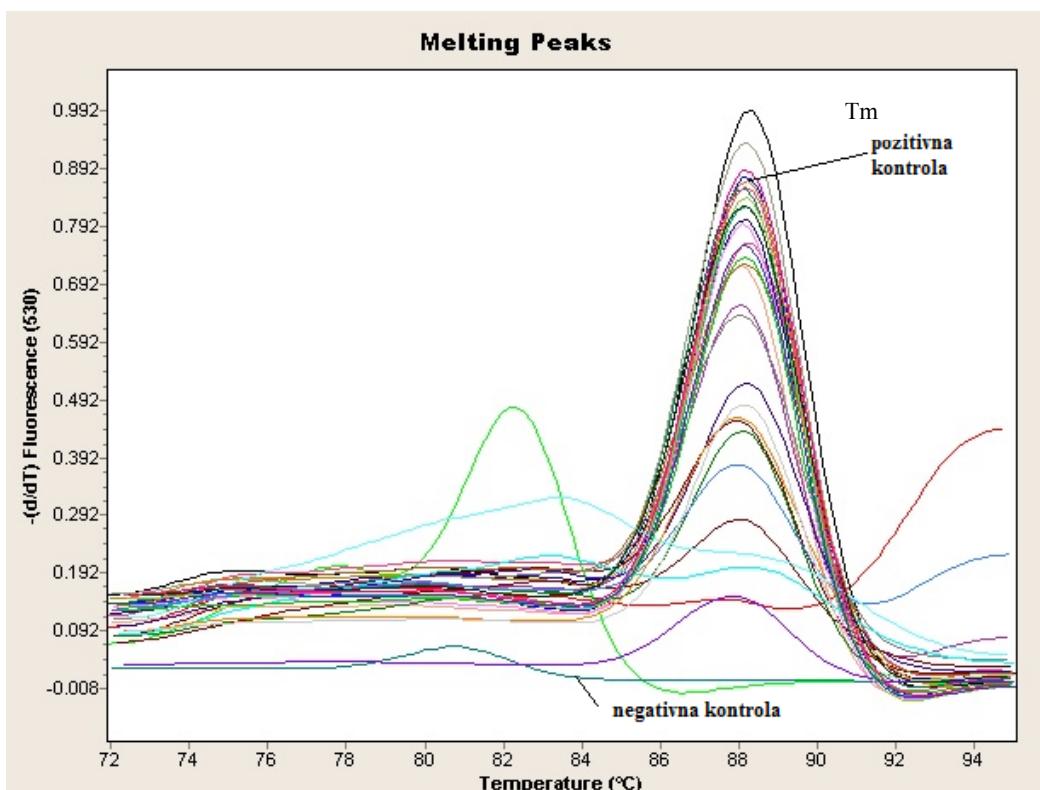
V Preglednici 22 je prikazana primerjava obeh molekularnih testov iz katere lahko razberemo, da ni bistvenih razlik med »in-house« metodo in testom s kitom MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

**Preglednica 22:** Primerjava rezultatov verižne reakcije s polimerazo v realnem času (PCR) z "in-house" metodo in s kitom MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija).

PCR	Občutljivost	Specifičnost	Pozitivna napovedana vrednost	Negativna napovedana vrednost
»In-house«	31 %	100 %	100 %	42 %
MycAssay <sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija)	36 %	100 %	100 %	50 %

#### 4.5 DOLOČANJE INHIBICIJE

Vse vzorce spodnjih dihal smo po izolaciji DNK analizirali še z aparaturom LightCycler (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind). Določali smo gen za β-globin. Glede na visoko število negativnih rezultatov obeh preiskovanih molekularnih testov, smo potrdili sum na prisotnost človeških zaviralcev reakcije PCR v realnem času, kar je vidno na Sliki 10. Vse krivulje, ki se nahajajo levo ali desno od pozitivne kontrole, nakazujejo pristonost zaviralcev v kliničnem vzorcu. Te vzorce (na Sliki 10 je razvidno, da jih je pet) smo prvič redčili v razmerju z vodo 3:2, drugič pa zamrznili in ponovili molekularni test z »in-house« metodo ter s kitom MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija). Rezultati so bili tokrat pozitivni pri obeh.



**Slika 10:** Grafični prikaz rezultatov vzorcev dobljenih pri testu pomnoževanja gena za  $\beta$ -globin z apraturo LightCycler (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind).

V Preglednici 23 vidimo povezavo med številom pozitivnih rezultatov posmeznega molekularnega testa in številom CFU *Aspergillus* spp. na Sabouraudovem gojišču (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija) posameznega kliničnega vzorca.

Tabela kaže, da je pozitivnost PCR reakcije sorazmerna številu kolonij *Aspergillus* spp.

**Preglednica 23:** Primerjava pozitivnih rezultatov verižne reakcije s polimerazo v realnem času (PCR) v povezavi s številom CFU na kulti Sabouraudovega gojišča (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija) pri vzorcih.

<b>Število CFU</b>	5	4	3	2	1
<b>Število kultur</b>	11	6	0	1	1
<b>MycAssay™</b>					
<b>Aspergillus</b> (Myconostica; Manchester, Velika Britanija)	45% (5/11)	33% (2/6)	(0/0)	0% (0/1)	0% (0/1)
<b>»In-house« PCR</b>	9 % (1/11)	17 % (1/6)	(0/0)	0 % (0/1)	0 % (0/1)

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Glive rodu *Aspergillus* so oportunistične plesni, ki povzročajo širok spekter bolezni in stanj. V zadnjih desetletjih se je pojavnost okužb z glivami znatno povečala, za kar je kriva naraščajoča populacija bolnikov s povečanim tveganjem za nastanek oportunističnih okužb (Mitchell, 2007; Latgé, 1999; Rementeria in sod., 2005; Warris in Verweij, 2005). Glive so odgovorne za nastanek številnih bolezni, od saprofitne kolonizacije do hitro razširjajoče se invazivne bolezni. Invazivna aspergiloza je glavni vzrok obolenosti in smrtnosti pri skrajno imunsko oslabljenih ljudeh (Preglednica 2); bolnikih z granulocitopenijo, s hematološkimi malignimi obolenji, po presaditvi organov in krvotvornih matičnih celic. Prav iz tega razloga so izbruhi pogosti v bolnišnicah na intenzivni negi (Garnacho-Montero in sod., 2005). *Aspergillus fumigatus* je najbolj patogena vrsta tega rodu in je v več kot 90 % povzročitelj invazivne aspergiloze. Koncentracija virulentnih dejavnikov po okužbi narašča do tolikšne mere, da lahko poškoduje celice in omogoči invazivno širjenje (Rementeria in sod., 2005). Za dokazovanje *Aspergillus* spp. se uporablajo tako klasične metode; neposredne tehnike, kultura, dokazovanje različnih komponent celic, kot tudi sodobne molekularne tehnike (Walsh in sod., 2008).

Glede na namen dela, s katerim smo želeli primerjati dve metodi pomnoževanja DNK *Aspergillus* spp., smo predhodno določili občutljivost PCR v realnem času tako z »*in-house*« metodo kot z MycAssay™ Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) na več načinov; analitično in klinično.

Preverili smo analitično občutljivost PCR reakcije v kulturi *Aspergillus* ATCC 14110. Pripravili smo jo v koncentraciji  $10^6$  CFU/ml in iz nje naredili redčitveno vrsto od  $10^5$  do  $10^0$  CFU/ml. Iz teh koncentracij smo nato izolirali DNK. Delali smo v treh vzporednikih. Redčitveno vrsto smo predhodno preverili tudi z nacepitvijo na Sabouraudov agar (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija), kjer se je ta izkazala za ustrezno redčeno in kasneje tudi sovpadala z rezultati obeh molekularnih testov. Rast je bila vidna na gojiščih z redčitvami do  $10^2$  CFU/ml (Preglednica 11), pozitivni pa so bili tudi rezultati obeh molekularnih testov (Preglednici 12 in 13). Odstopanje je opazno pri redčitvi  $10^1$ ; kultura

je zrastla, PCR reakcija pa je bila negativna. Vzrok je lahko v kontaminaciji gojišča, na katerega je lahko prišev sev, ki ni iz vzorca. Obstaja pa tudi možnost, da v postopek obdelave vzorca nismo zajeli gline in je bil PCR negativen. Pomnoževali smo DNK po obeh protokolih. Iz dobljenih rezultatov v Preglednici 12 in 13 lahko sklepamo, da je PCR reakcija v kulturi *Aspergillus* ATCC 14110 dovolj občutljiva, ko je v suspenziji prisotno od  $10^6$  do  $10^2$  CFU/ml aspergilov. V postopku izolacije DNK iz kužnin smo uporabili tako kemijske kot fizikalne sile za razgradnjo človeške sluzi in celične stene gliv, da bi pri izolaciji pridobili čim večjo koncentracijo glivne DNK. Pri obeh protokolih PCR v realnem času smo dobili negativne rezultate pri koncentracijah  $10^1$ , 5, 2'5 in 1 CFU/ml. To bi lahko pomenilo, da je pri tako nizkih koncentracijah aspergilov v kužnini zelo malo verjetno, da bi z vsemi predhodnimi postopki dovolj obdelali kužnino, da bi se sprostil zadostni delež DNK, ki bi dal pozitiven rezultat.

Težko opredelimo katera od metod je bolj analitično občutljiva. Pri obeh molekularnih metodah dobimo podobne rezultate, in sicer pri »*in-house*« testu 31 % in pri MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) 36 % (Preglednica 22). Testa zaznata pozitivne rezultate redčitvene vrste z vodo izolirane DNK  $10^6$  CFU/ml referenčnega seva *Aspergillus*, in sicer od koncentracij  $10^6$  do  $10^4$  CFU/ml. Razlike se pojavijo pri redčitvah  $10^3$  in  $10^2$ . Test s kitom MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) zazna 100 % pozitivnih rezultatov tako pri redčitvi  $10^3$ , kot pri  $10^2$ , medtem ko »*in-house*« test zazna 67 % pri  $10^3$  in 33 % pri  $10^2$  pozitivnih rezultatov (Preglednici 12 in 13). Pri obeh protokolih so bili rezultati od  $10^1$  do 1 negativni.

Pri obeh molekularnih testih, tako »*in-house*« kot MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija), smo skušali dokazati, ali sta testa dovolj specifična za diagnostično uporabo. Glede na primerjavo pozitivnih rezultatov kultivacije kliničnih vzorcev z rezultati PCR, smo ugotovili da imata oba testa 100 % analitično specifičnost (Preglednica 22). To pomeni, da bo vsak pozitiven PCR v realnem času imel tudi rast kulture na gojišču. Analitično specifičnost smo še dodatno preverili z vzorci izolirane DNK različnih mikroorganizmov (glej Preglednico 19) in po rezultatih sodeč, še dodatno potrdili 100 % specifičnost obeh molekularnih testov. Iz tega lahko sklepamo, da sta testa specifična za dokazovanje *Aspergillus* spp. v vzorcih spodnjih dihal in da so pozitivni

rezultati resnično pozitivni ter da smo se v tem primeru odločili za pravilno izbiro oligonukleotidnih začetnikov.

Izračunali smo pozitivno napovedano vrednost, ki v naših analizah poda kolikšen delež bolnikov s pozitivnim rezultatom ima pozitivno kulturo. Pri obeh PCR v realnem času smo dobili 100 % pozitivno napovedano vrednost, ki poda resnično zanesljivost pozitivnih rezultatov (Preglednica 22). Pozitivni rezultati molekularni testov podajo informacijo, da bodo pozitivne tudi kulture teh vzorcev.

Negativna napovedana vrednost se med obema testoma razlikuje za osem odstotkov, in sicer za »*in-house*« test 42 % ter s komercialno dostopnim kitom MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) 50 % (Preglednica 22). Ti odstotki povedo kolikšen delež bolnikov z dobljenim negativnim izidom bo imelo tudi negativno kulturo.

Izhodiščni volumen kliničnega vzorca, katerega smo uporabili v raziskovalne namene, je bil 1 ml. Poizkusili smo tudi izolirati DNK iz izhodnega volumena vzorca 500 µl in ugotovili, da PCR zazna nižji CFU pri večjem izhodiščnem volumnu. Tudi v drugih člankih je nakazano, da PCR v realnem času zazna DNK do  $10^3$  *Aspergillus* spp. v kliničnem vzorcu (Sanguinetti in sod., 2003).

Glede na rezultate kultivacije, kjer je bilo pozitivnih 33 vzorcev sponjih dihal, je bilo pri »*in-house*« testu 25 (Preglednica 20) in pri testu s kitom MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) 18 lažno negativnih rezultatov (Preglednica 21). Za tak izid je možnih več vzrokov, in sicer je bila lahko v kliničnem vzorcu nizka koncentracija gliv. Obstaja tudi možnost, da smo pri prenosu vzorca v predhodno obdelavo in nadaljnjo izolacijo zajeli manj gliv, kot je bilo dejansko v povprečju prisotno v kliničnem vzorcu. Na rezultate je vplivala tudi obdelava kužnine, s posledičnim vplivom mikroorganizma in njegove kompleksne polisaharidne strukture celične stene. Najobsežnejši delež celične stene predstavlja polisaharid, in sicer  $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glukan, na katerega se pripenjata tudi galaktomanan in hitin, ki predstavljajo oviro tako pri kemični kot fizikalni obdelavi kužnine, saj je zelo težko razbiti celično steno in sprostiti dovolj DNK iz celic (Rementeria in sod., 2005). Obstaja možnost prisotnosti različnih človeških zaviralcev pomnoževanja DNK. Slednjo trditev smo tudi preverili z aparaturom LightCycler Roche Molecular Systems, Indianapolis, Ind), v katerem je potekal test za zaznavanje  $\beta$ -

globina. Pri nekaterih vzorcih je bila res zaznana prisotnost človeških zaviralcev, ki bi lahko vplivali na pomnoževanje glivne DNK (Slika 10). Te vzorce z izolirano glivno DNK smo nato zamrznili in ponovili test PCR. Prav tako smo te iste vzorce redčili v razmerju z vodo 3:2 in v obeh primerih dobili pozitivne rezultate. Z redčenjem izolirane DNK kliničnega vzorca ali njegovo zamrznitvijo, smo zmanjšali zaviralce PCR reakcije v vzorcu. Torej bi lahko po izolaciji DNK uvedli še zamrzovanje ali redčenje vzorca, saj s tem očitno uničimo oz. razredčimo človeške zaviralce.

Vseh analiziranih kliničnih vzorcev je bilo 51. Od tega je bilo 65 % pozitivnih kultur, 16 % pozitivnih pri »*in-house*« metodi in 29 % pozitivnih pri testu s kitom MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) (Preglednica 16). Kultura velja kot zlati standard v diagnostiki invazivne aspergiloze. Problem pri tej metodi predstavlja lažno pozitivni rezultati, ki so lahko posledica kontaminacije iz okolja, na kar lahko vpliva tudi čas kultivacije. Iz Preglednice 23 je razvidno, da je največji odstotek pozitivnih rezultatov molekularnih testov ravno pri pozitivnih kulturah z zrastlimi največ CFU. Pri 5 CFU na ploščah je bilo od tega pozitivnih 45 % (tj. 5/11) pri testu s kitom MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) in 9 % (tj. 1/11) pri »*in-house*« testu. Pri 4 CFU zrastlih na ploščah je bilo od tega pozitivnih 33 % (tj. 2/6) pri testu s kitom MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) in 17 % (tj. 1/6) pri »*in-house*« testu. Iz tega lahko sklepamo, da je bilo v kliničnem vzorcu prisotno veliko mikroorganizmov, kar pomeni, da smo iz teh vzorcev izolirali tudi večjo količino glivne DNK. Boljše rezultate dobimo pri testu s kitom MycAssay™ *Aspergillus* (Myconostica; Manchester, Velika Britanija). Vzroki so verjetno v različnih oligonukleotidnih začetnikih in različnih temperaturnih ciklih pri obeh protokolih. Če je prisotno dovolj gliv v vzorcu, bodo tudi te hitreje zrastle, medtem ko se čas inkubacije daljša, obstaja tudi možnost kontaminacije iz okolja, saj so *Aspergillus* spp. ubikvitarni glive. Menimo, da se to zgodi le v skrajnih primerih, saj ostaja glede na dobljene rezultate v tej raziskavi, kultivacija še zmeraj zlati standard za dokazovanje invazivne aspergiloze in tudi kot zadnja potrditev prisotnosti aspergilusa pri negativnih rezultatih molekularnih testov.

Zbrani podatki raziskovalcev Khot in Fredricks (2009), nakazujejo, da obstaja kar nekaj PCR v realnem času, tudi s tarčnimi geni 18S rRNK, kot v našem primeru. Pri vseh je opazna boljša občutljivost testa kot pri nas, saj znaša od 67 do 100 %, v našem primeru pa le 31 %. Prav tako so opazne variabilnosti v specifičnosti, saj z »*in-house*« metodo dobimo 100 % specifičnost testa, v raziskavah pa je viden razpon od 87,7 % do 100 %. Vidne so razlike v pozitivni in negativni napovedani vrednosti testov PCR v realnem času. Dobili smo višjo pozitivno napovedano vrednost v primerjavi s podatki zbranih s strani Khota in Fredricka iz leta 2009, in sicer so bili rezultati višji kar od 80 % primerov. Metoda »*in-house*« ima nedvomno veliko pomanjkljivost, in sicer zelo nizko negativno napovedano vrednost (tj. 31 %), medtem ko se pri ostalih raziskavah ta številka giba od 92 do 100 %.

Glede na to, da smo uporabili oligonukleotidne začetnike iz postopka raziskovalca Sanguinettija s sodelavci iz leta 2003, lahko potrdimo, da smo tako kot skupina teh raziskovalcev dobili 100 % specifičnost in pozitivno napovedano vrednost testa. Vsekakor pa smo dobili zelo nizke rezultate občutljivosti in negativne napovedane vrednosti. To bi bil lahko vzrok v predhodni obdelavi kliničnih vzorcev pred izolacijo DNK.

## 5.2 SKLEPI

- Meja občutljivosti PCR v realnem času v kulturi *Aspergillus* spp. v vodi je  $10^2$  CFU/ml.
- Obe molekularni metodi, tako »*in-house*« kot s kitom MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija), sta primerljivi; imata 31 in 36 % občutljivost, 100 % specifičnost, 42 in 50 % negativno napovedano vrednost in 100 % pozitivno napovedano vrednost.
- Pravilno smo izbirali oligonukleotidne začetnike pri »*in-house*« metodi.
- Potrebno je zmanjšanje človeških zaviralcev PCR reakcije v kliničnih vzorcih z zamrznitvijo ali redčenjem izolirane DNK in nato izvedba pomnoževanja DNK.
- V diagnostiki bi lahko uporabljali obe molekularni metodi, vendar bi se zaradi cenejše izvedbe testa odločili za uporabo »*in-house*« metode.

## 6 POVZETEK

Glive rodu *Aspergillus* so oportunistične plesni, ki povzročajo širok spekter bolezni in stanj. Pri imunsko oslabljenih ljudeh lahko povzročajo smrtno nevarno okužbo, ki jo imenujemo invazivna aspergiloza. Najpogosteje prizadene pljuča. Vzrok je v okvari mitetaličnega epitelija in aktivnosti alveolarnih makrofagov v dihalih. Za dokazovanje *Aspergillus* spp. se uporablajo tako klasične metode; neposredne tehnike barvanja kliničnih vzorcev, kultura, dokazovanje različnih komponent celic, kot tudi molekularne tehnike. Verižna reakcija s polimerazo v realnem času omogoči kvantifikacijo glivične obremenitve v kliničnem vzorcu, kar nam poda informacije o bremenu ali napredovanju bolezni. Primerjali smo komercialno dostopni kit MycAssay<sup>TM</sup> Aspergillus (Myconostica; Manchester, Velika Britanija) z »in-house« metodo. »In-house« metoda je cenejša in bolj dostopna, ima pa enako občutljivost in specifičnost kot komercialno dostopni kit. Problem se pojavi zaradi zaviralcev v kliničnih vzorcih, ki zavirajo pomnoževanje DNK. Zato bi lahko vzorce z izolirano DNK zamrznili ali redčili z vodo pred nadaljnjo analizo s PCR v realnem času. Dobljene pozitivne rezultate smatramo kot resnično pozitivne, medtem ko je pri negativnih zelo nizka verjetnost, da so ti rezultati resnično negativni. Nujna je izboljšava v postopku obdelave kužnine pred izolacijo DNK, saj nam problem predstavlja kompleksna zgradba celične stene glive. Glede na dobljene rezultate, lahko potrdimo, da PCR v realnem času tako z »in-house« metodo kot tudi s komercialno dostopnim kitom motijo človeški zaviralcji v primerjavi. Vsekakor pa je nujno dopolniti molekularne metode s kultivacijo.

## 7 VIRI

Aquino V.R., Goldani L.Z., Pasqualotto A.C. 2007. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia*, 163: 191-202

Becker M.J., Lugtenburg E.J., Cornelissen J.J., van der Schee C., Hoogsteden H.C. de Marie S. 2003. Galactomannan detection in computurized tomography-based bronchoalveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *British Journal of Haematology*, 121: 448-457

Cepheid. 2012. SmartCycler system. Sunnyvale, Cepheid: 1 str.  
<http://www.cepheid.com/systems-and-software/smartercycler-system> (Januar 2012)

Chamilos G., Kontoyiannis D.P. 2006. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Medical Mycology*, 44, Suppl. 1: S163-S172

De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P., Stevens D.A., Edwards J.E., Calandra T., Pappa P.G., Maertens O.L., Kauffman C.A., Denning D.W., Patterson T.F., Mascmeyer G., Bille J., Dismukes W.E., Herbrecht R., Hope W.W., Kibbler C.C., Kullberg B.J., Marr K.A., Muñoz P., Odds F.C., Perfect J.R., Restrepo A., Ruhnke M., Segal B.H., Sobel J.D., Sorrel T.C., Viscoli C., Wingard J.R., Zaoutis T., Bennet J.E. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer. *Clinical Infectious Diseases*, 46: 1813-1821

Ellepola A.N.B., Morrison C.J. 2005. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Journal of Microbiology*, 43, Special issue: 65-84

Francesconi A., Kasai M., Petraitiene R., Petraitis V., Kelaher A.M., Schaufele R., Hope W.W., Shea Y.R., Bacher J., Walsh T.J. 2006. Characterization and comparison of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR assay for detection of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluid for experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 7: 2475-2480

- Fréale E., Decrucq K., Botterel F., Bouchindhomme B., Camus D., Dei-Cas E., Costa J.M., Yakoub-Agha I., Bretagne S., Delhaes L. 2009. Diagnosis of invasive aspergillosis using bronchoalveolar lavage in haematology patients: influence of bronchoalveolar lavage human DNA content on real-time PCR performance. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 28: 223-232
- Garnacho-Montero J., Amaya-Villar R., Ortiz-Leyba C., León C., Alvarez-Lerma F., Nolla-Salas J., Iruretagoyena J.R., Barcenilla F. 2005. Isolation of *Aspergillus* spp. from respiratory tract in critically ill patients: risk factors, clinical presentation and outcome. Critical Care, 9: 191-199
- Gordis L. 2004. Epidemiology. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, Elsevier Saunders: 71-94
- Hachem R.Y., Kontoyiannis D.P., Chemaly R.F., Jiang Y., Reitzel R., Raad I. 2009. Utility of galactomannan enzyme immunoassay an (1,3)  $\beta$ -D-glucan in diagnosis of fungal infections: Low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. Journal of Clinical Microbiology, 47: 129-133
- Halliday C., Hoile R., Sorrell T., James G., Yadav S., Shaw P., Bleakley M., Bradstock K., Chen S. 2005. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. British Journal of Haematology, 132: 478-486
- Hope W.W., Walsh T.J., Denning D.W. 2005. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infectious Diseases, 5: 609-622
- Jothikumar P., Hill V., Narayanan J. 2009. Design of FRET-TaqMan probes for multiplex real-time PCR using an internal positive control. BioTechniques, 46, 7: 519-524
- Kawazu M., Kanda Y., Goyama S., Takeshita M., Nannya Y., Niino M., Komeno Y., Nakamoto T., Kurokawa M., Tsujino S., Ogawa S., Aoki K., Chiba S., Motokura T., Oishii N., Hirai H. 2003. Rapid diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis by

- quantitative polymerase chain reaction using bronchial lavage fluid. American Journal of Hematology, 72: 27-30
- Khot P.D., Fredricks D.N. 2009. PCR-based diagnosis of human fungal infection. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 7: 1201-1221
- Kirchgesser M., Schlagenhauf R., Kirchner B., Adem C., Malmberg W., Tgetgel A., Huber I., Nirswandt V., Walter T. 2003. The New MagNA pure compact nucleic acid isolation kits – fast and flexible fully automated sample preparation. Biochemica, 4: 12-14
- Klingspor L., Loeffler J. 2009. *Aspergillus* PCR formidable challenges and progress. Medical Mycology, 47: 241-247
- Latgé J.P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clinical Microbiology Reviews, 12: 310-335
- Latgé J.P. 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends in Microbiology, 9: 382-389
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Survey and summary: real-time PCR in virology. Nucleic Acids Research, 30: 1292-1305
- Mackenzie D.W.R. 1988. *Aspergillus* in man. V: *Aspergillus* and aspergillosis: Proceedings of the second international symposium on topics in mycology, June 28 – July 1, 1987, Antwerp, Belgium. VandenBossche H., Mackenzie D.W.R. (eds.). New York, Plenum Press: 1-8
- Marr K.A., Laverdiere M., Gugel A., Leisenring W. 2005. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. Clinical Infectious Diseases, 40: 1762-1769
- Matos T. 2002. Oportunistične glive. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 481-499

Mengoli C., Cruciani M., Barnes R.A., Loeffler J., Donnelly P. 2009. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. Lancet Infectious Diseases, 9: 89-96

Mitchell T.G. 2007. Medical mycology V: Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology. 24<sup>th</sup> ed. Brooks G.F., Carroll K.C., Butel J.S., Morse S.A. (eds.). New York, McGraw-Hill: 621-648

Odabasi Z., Mattiuzzi G., Estey E., Kantarjian H., Saeki F., Ridge R.J., Ketchum P.A., Finkelman M.A., Rex J.H., Ostrosky-Zeichner L. 2004.  $\beta$ -D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patient with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. Clinical Infectious Diseases, 39: 199-205

Perfect J.R., Cox G.M., Lee J.Y., Kauffman C.A., de Repentigny L., Chapman S.W., Morrison V.A., Pappas P., Hiemenz J.W., Stevens D.A. 2001. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. Clinical Infectious Diseases, 33: 1824-1833

Raad I., Hanna H., Sumoza D., Albitar M. 2002. Polymerase chain reaction on blood for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in cancer patients. Cancer, 94: 1032-1036

Read N.D., Jeffree C.E. 1991. Low temperature scanning electron microscopy in biology. Journal of Microscopy, 161: 59-72

Rementeria A., López-Molina N., Ludwig A., Vivanco A.B., Bikandi J., Pontón J., Garaizar J. 2005. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. Revista Iberoamericana de Micología, 22, 1: 1-23

Roche. 2012. MagNA pure compact instrument. Indianapolis, Roche Diagnostics: 1 str.  
<https://www.roche-applied-science.com/sis/automated/compact/index.jsp> (november 2011)

Samson R.A., Pitt J.I. 2000. Nomenclature of *Penicillium* and *Aspergillus* and their teleomorphs: types of *Aspergillus* and *Penicillium* and their teleomorphs in current use. V: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Samson R.A., Pitt J.I. (eds.). Abingdon, Harwood Academic Publishers: 51-72

Sanguinetti M., Posteraro B., Pagano L. Pagliari G., Fianchi L., Mele L., La Sorda M., Franco A., Fadda G. 2003. Comparison of real-time PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Journal of Clinical Microbiology, 41, 8: 3922-3925

Simičič S., Matos T. 2010. Mikrobiološka diagnostika invazivne aspergiloze. Zdravniški vestnik, 79: 716-725

Stynen D., Sarfati J., Goris A., Prévost M.C., Lesourd M., Kamphuis H., Darras V., Latgé J.P. 1992. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. Infection and Immunity, 60, 6: 2237-2245

Swanink C.M.A., Meis J.F.G.M., Rijs A.J.M.M., Donnelly J.P., Verweij P.E. 1997. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan. Journal of Clinical Microbiology, 35, 1: 257-260

Uffredi M.L., Mangiapan G., Cadranel J., Kac G. 2003. Significance of *Aspergillus fumigatus* isolation from respiratory specimens of nongranulocytopenic patients. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 22: 457-462

Vandewoude K.H., Blot S.I., Depuydt P., Benoit D., Temmerman W., Colardyn F., Vogelaers D. 2006. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. Critical Care, 10: R31, doi: 10.1186/cc4823: 10 str.

Vrettou C., Traeger-Synodinos J., Tzetis M., Malamis G., Kanavakis E. 2003. Rapid screening of multiple β-globin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler:

- application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes.  
*Clinical Chemistry*, 49, 5: 769-776
- Walsh T.J., Anaissie E.J., Denning D.W., Herbrecht R., Kontoyiannis D.P., Marr K.A., Morrison V.A., Segal B.H., Steinbach W.J., Stevens D.A., van Burik J., Wingard J.R. Patterson T.F. 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 46: 327-360
- Warris A., Verweij P.E. 2005. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 43, Suppl. 1: S59-S65
- Wheat L.J., Walsh T.J. 2008. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27: 245-251
- White P.L., Shetty A., Barnes R.A. 2003. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *Journal of Clinical Microbiology*, 52: 229-238
- Woods G., Miceli M.H., Grazziutti M.L., Zhao W., Barlogie B., Anaissie E. 2007. Serum *Aspergillus* galactomannan antigen values strongly correlate with outcome of invasive aspergillosis: a study of 56 patients with hematologic cancer. *Cancer*, 110: 830-834
- Wortmann G., Hochberg L.P., Arana B.A., Rizzo N.R., Arana F., Ryan J. R. 2007. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Guatemala using a real-time polymerase chain reaction assay and the smart cycler. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76, 5: 906-908
- Zalar P., Gunde-Cimerman N. 2002. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Študentska založba: 56-57

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Tadeji Matos, dr. med., spec. klin. mikrobiol. za sprejetje mentorstva.

Posebno zahvalo namenjam Romini Kofol, univ. dipl. mikrobiol. za uvajanje v delo v laboratoriju, nasvete pri izvedbi praktičnega dela, čas za moja vprašanja in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Evi Ružić-Sabljić, dr. med., spec. klin. mikrobiol. za recenzijo diplomske naloge.

Najlepša hvala tudi staršem in sestri za vso podporo in zaupanje ter vsem prijateljem za moralno spodbudo v času študija.