

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Anja JARC

**PRIMERJAVA TREH METOD ZA IZOLACIJO DNK
KVASOVK RODU *Candida***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Anja JARC

**PRIMERJAVA TREH METOD ZA IZOLACIJO DNK KVASOVK
RODU *Candida***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF THREE ISOLATION METHODS FOR
EXTRACTION DNA *Candida***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Jarc A. Primerjava treh metod za izolacijo DNK kvasovk rodu *Candida*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologija, 2011

Diplomsko delo je zaključek 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 in za recenzentko prof. dr. Nina Gunde-Cimerman, univ. dipl. biol.

Mentorica: doc. dr. Tadeja Matos, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman, univ. dipl. biol.

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.

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

Članica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anja Jarc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.61: 616-078: 582.28: 577.2.083(043)= 163.6 kandidemija/ <i>Candida albicans</i> / <i>Candida glabrata</i> / diagnostične metode/
KG	molekularna diagnostika/ izolacija glivne DNK/ ročna izolacija/ avtomatska izolacija/
AV	JARC, Anja
SA	MATOS, Tadeja (mentorica)/ GUNDE-CIMERMAN, Nina (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	PRIMERJAVA TREH METOD ZA IZOLACIJO DNK KVASOVK RODU <i>Candida</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 43 str., 11 pregl., 5 sl., 2 pril., 36 vir
IJ	sl
JI	sl/en
AI	

V zadnjih desetletjih incidenca okužb z glivami rodu *Candida* narašča zaradi uporabe širokospektralnih antibiotikov, operativnih posegov in kemoterapij. Okužbe krvnega obtoka z glivami pogosto povzročajo majhno število glivnih celic, tudi manj kot 10 celic na ml krvi, kar je težko zaznati v krvnih vzorcih. Z razvojem molekularnih metod se je diagnostika močno izboljšala, vendar se je izkazalo, da je zahtevna. Primerjali smo avtomatizirano izolacijo z MagNA Pure Compact, ročno izolacijo z YeaStar Genomic kit in Qiagen Blood mini kit. Želeli smo ugotoviti, katera izolacijska metoda je najbolj občutljiva in specifična za rutinsko diagnostiko glivičnih okužb. Poskus smo izvedli v več ponovitvah padajočih koncentracij glivnih celic v vodnem mediju in krvi zdravih prostovoljcev. Izolirano DNA smo pomnoževali z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) na Smart Cycler II aparatu. Ugotovili smo, da je najbolj primerna izolacija avtomatska z MagNA Pure Compact. Za kvasovko *Candida albicans* smo zaznali 1 CFU/ml krvi in 10 CFU/ml za kvasovko *Candida glabrata*. Za izolacijo je najbolj občutljiv vzorec celotne krvi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDK 579.61: 616-078: 582.28: 577.2.083(043)= 163.6 candidemia/ <i>Candida albicans</i> / <i>Candida glabrata</i> / diagnostic methods/
CX	molecular diagnostics/ extraction of fungal DNA/ manual isolation/ automated isolation/
AU	JARC, Anja
AA	MATOS, Tadeja (supervisor)/ GUNDE-CIMERMAN, Nina (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2011
TI	COMPARISON OF THREE ISOLATION METHODS FOR EXTRACTION DNA <i>Candida</i>
DT	Graduation Thesis (university studies)
NO	X, 43 p., 11 tab., 5 fig., 2 ann., 36 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	

In last decades incidence with *Candida* infections is increasing by the use of widebroad antibiotics, operation procedures and chemoteraphy. Bloodstream infections can usually be caused with less than 10 cells in ml of blood, which can be difficult for detection. With development of molecular methods, detection improved but isolation of fungal DNA remained a crucial step. We compared automated isolation MagNA Pure Compact, manual YeaStar Genomic kit and Qiagen blood mini kit, to determine which isolation is most specific and sensitive for diagnostics of yeast infections. The study was performed in a water medium and in blood from healty vounteers with different concentrations. We used Smart Cycler II for deection of isolated DNA. Optimal isolation of fungal DNA was with automated MagNA Pure Compact. Detection limit for *Candida albicans* were 1 CFU/ml and 10 CFU/ml fot *Candida glabrata*. The most suitable sample for isolation was whole blood.

KAZALO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
KAZALO OKRAJŠAV	X
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KLASIFIKACIJA, EKOLOGIJA IN LASTNOSTI GLIV RODU <i>Candida</i>	3
2.2 EPIDEMIOLOGIJA IN DEJAVNIKI TVEGANJA ZA NASTANEK OKUŽBE	4
2.3 PATOGENEZA IN VIRULENČNI DEJAVNIKI <i>Candida</i> spp	6
2.4 OKUŽBE, KI JIH POVZROČAJO VRSTE IZ RODU <i>Candida</i>	8
2.4.1 Povrhnja kandidoza	8
2.4.2 Kronična mukokutana kandidoza	9
2.4.3 Sistemska kandidoza	9
2.5 DIAGNOSTIKA KANDIDEMIJE POVZROČENE Z VRSTAMI RODU <i>Candida</i>	10
2.5.1 Molekularna diagnostika	11
2.5.1.1 Vzorci za izolacijo DNK	11
2.5.1.2 Izolacija DNK	12
2.5.1.3 Preverjanje kvalitete in čistost izolirane DNK	14
2.5.1.4 Pomnoževanje glivne DNK z verižno reakcijo s polimerazo	14
2.5.1.5 PCR v realnem času	16
2.5.1.6 SmartCycler PCR	18
2.6 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽB Z GLIVAMI RODU <i>Candida</i>	19
3 MATERIALI IN METODE.....	22
3.1 VZORCI.....	22
3.2 METODE DELA	22
3.2.1 Ročna izolacija z referenčnim kompletom (Qiagen)	23
3.2.2 Ročna izolacija z YeaStar izolacijskim kompletom (YeaStar).....	24
3.2.3 Avtomatska izolacija z MagNA Pure Compact izolacijskim kompletom (MagNA Pure).....	24
3.2.4 Pomnoževanje in analiza izolirane DNK.....	26
4 REZULTATI.....	30
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	33
5.1 RAZPRAVA	33

Jarc A. Primerjava treh metod za izolacijo DNK kvasovk rodu *Candida*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologija, 2011

5.2	SKLEPI	36
6	POVZETEK	37
7	VIRI	38
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prikaz možnih molekularnih metod za diagnostiko kandidemij (Ellepoa in Morrison, 2005; Preuner in Lion, 2009; White in sod., 2003; Inacio in sod., 2008; Sullivan in sod., 1996)	16
Preglednica 2: Prikaz kanalov za posamezna barvila, njihov vrh absorbance in emisije v nm na SmartCycler aparatu (Cepheid, 2011)	18
Preglednica 3: Prikaz količine mešanice za PCR za en vzorec za <i>C. albicans</i> in <i>C. glabrata</i>	27
Preglednica 4: Prikaz vrstno specifičnih oligonukleotidnih začetnikov in sond za <i>C. albicans</i> in <i>C. glabrata</i>	27
Preglednica 5: Povprečne vrednosti CT in delež pozitivnih reakcij izolacije glivne DNK za <i>C. albicans</i> in <i>C. glabrata</i> v vodnem mediju za koncentracije 10^6 do 10^0 CFU/ml	30
Preglednica 6: Povprečne vrednosti CT in delež pozitivnih reakcij izolacije glivne DNK za <i>C. albicans</i> in <i>C. glabrata</i> iz krvi z EDTA za koncentracije 10^4 do 10^1 CFU/ml	31
Preglednica 7: Povprečne vrednosti CT in delež pozitivnih reakcij izolacije glivne DNK za <i>C. albicans</i> in <i>C. glabrata</i> iz krvi z EDTA z MagNA Pure izolacijo za koncentracije 5 CFU/ml, 2.5 CFU/ml in 1 CFU/ml	31
Preglednica 8: Povprečne vrednosti CT in delež pozitivnih reakcij izolacije glivne DNK za <i>C. albicans</i> in <i>C. glabrata</i> iz celotne krvi z EDTA, usedline in plazme z MagNA Pure izolacijo za koncentracije 10^4 , 10^2 in 10^1 CFU/ml	32
Preglednica 9: Primerjava izolacijskih kompletov s časom obdelave in občutljivostjo za <i>C. albicans</i> in <i>C. glabrata</i>	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Izolacijski komplet Qiagen Blood Mini kit	23
Slika 2: Izolacijski komplet YeaStar	24
Slika 3: Delovna miza MagNA Pure Compact	26
Slika 4: SmartCycler 25 µl tubica	28
Slika 5: SmartCycler II aparat z računalnikom, centrifugo in hladnim blokom	29

Jarc A. Primerjava treh metod za izolacijo DNK kvasovk rodu *Candida*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologija, 2011

KAZALO PRILOG

Priloga A: Prikaz pozitivnih rezultatov PCR in vrednosti CT v razmerju z naraščajočim številom ciklov za *Candida albicans*

Priloga B: Prikaz pozitivnih rezultatov PCR in vrednosti CT v razmerju z naraščajočim številom ciklov za *Candida glabrata*

KAZALO OKRAJŠAV

CFU	angl. colony forming units
CT	mejna vrednosti (angl. critical treshold)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ECMM	angl. European Confederation of Medical Mycology
EDTA	angl. Ethylenediaminetetraacetic acid
FISH	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (angl. fluorescent <i>in situ</i> hybridization)
IPK	interna pozitivna kontrola
MIC	minimalna ihibitorna koncentracija (angl. minimal inhibitor concentration)
MMX	angl. mastermix
PCR	reakcija z verižno polimerazo (angl. polimerase chain reaction)
RCBL	pufer za lizo eritrocitov (angl. red cell lysis buffer)
TxR	angl. Texas Red

1 UVOD

V zadnjih treh desetletjih incidenca glivičnih okužb narašča, predvsem med imunsko oslabeledimi in hospitaliziranimi bolniki s težkimi boleznimi. Med pomembne dejavnike tveganja za nastanek glivičnih okužb, sodijo predvsem masivna uporaba širokospektralnih antibiotikov, citotoksične kemoterapije ter zdravljenje s presaditvijo (Pfaller in Diekema, 2007).

Vrste rodu *Candida* so postale pogost oportunistični patogen, saj predstavljajo kar 15 % vseh bolnišničnih okužb. Vrste rodu *Candida* so povzročitelji več kot 72 % bolnišničnih glivičnih okužb, v nekaterih centrih predstavljajo 8 do 15 % vseh izolatov iz hemokultur, kar 25 do 50 % kandidemij se pojavi v terciarnih zdravstvenih ustanovah (Vazquez, 2003). V Združenih državah Amerike so četrti najpogostejši izolirani povzročitelj okužb krvnega obtoka in povzročajo visoko stopnjo umrljivosti, ki dosega 40 %. Najpogosteje izolirana vrsta je *Candida albicans*, ki povzroča kar 66 % vseh kandidoz. Na nekaterih področjih vedno večji delež predstavlja *C. glabrata* (3 do 35 %). Nekateri menijo, da je naraščajoča incidenca *C. glabrata* in *C. krusei* predvsem posledica visoke uporabe flukonazola, saj vemo, da sta ti dve vrsti manj občutljivi za azole (Vazquez, 2003; Hachem in sod., 2007; Conde-Rosa in sod., 2010). Hkrati so opazne pogostejše okužbe s *C. parapsilosis*, kot posledica virulentnih dejavnikov, kot so adhezija ter tvorba biofilmov (Conde-Rosa in sod., 2010; Pfaller in Diekema, 2007). Več kot 17 vrst rodu *Candida* je bilo opisanih, kot povzročiteljic invazivnih kandidoz, a kar 90 % okužb povzročajo vrste: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* (Pfaller in Diekema, 2007).

Glive so del normalne flore kože, sluznic ustne votline, žrela, prebavnih poti in spolovil. Ob poškodbi epitelija ali ob njegovi spremembi zaradi hormonskih vplivov ali povečane adhezivnosti gliv na epitelijsko površino, lahko pride do prekomerne namnožitve, invazije v globlje plasti in krvožilni sistem. Povzročajo okužbe kože in podkožja, kronične mukokutane kandidoze ter sistemske okužbe (Matos, 2002a).

Izolacija *Candida* spp. iz hemokultur, kot trenutni zlati standard, je dolgotrajna in slabo občutljiva metoda, saj kar pri 50 % bolnikov s kandidemijo, gliv ne zaznamo (Lau in sod., 2010). Hkrati je potrebna naknadna izolacija in fenotipska identifikacija kultur. To

je vodilo v razvoj hitrejših alternativnih tehnik, kot so fluorescentna *in situ* hibridizacija (*angl.* fluorescent in situ hybridisation, FISH) ter zaznavanje prisotnosti nukleinske kisline v vzorcih z metodo verižne reakcije s polimerazo (*angl.* polimerase chain reaction, PCR). Metode so občutljive, a jih je težko standardizirati v kliničnih laboratorijih (Lau in sod., 2010). Največji problem predstavlja predvsem zaznavanje prisotnosti glivne DNK, saj je običajno v krvi in drugih sterilnih tekočinah in tkivih prisotna v zelo nizki koncentraciji.

1.1 NAMEN DELA

Naš namen dela je bil:

- Primerjati tri različne kite za izolacijo gliv *C. albicans* in *C. glabrata*, dveh najpogostejših povzročiteljic kandidemij, iz vzorcev krvi z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (*angl.* real time PCR),
- Ugotoviti katera izolacijska metoda je najbolj občutljiva, najlažje izvedljiva in cenovno ugodna za rutinsko diagnostiko glivičnih okužb.

2 PREGLED OBJAV

V preteklosti smo obravnavali glive kot saprofitske organizme, ki so redko povzročali bolezni pri ljudeh. Število okužb z njimi pa se je zaradi napredka zdravljenja, v preteklosti nezdravljenih, težkih bolezni in pogostejše uporabe zdravil, ki oslabijo imunski sistem, povečalo (Fidel in sod., 1999).

2.1 KLASIFIKACIJA, EKOLOGIJA IN LASTNOSTI GLIV RODU *Candida*

Povzročitelji najpogostejših glivičnih okužb pripadajo vrstam rodu *Candida*, ki spadajo v družino *Cryptococcaceae*, red *Moniliales*, razred *Deuteromycetes* (Fidel in sod., 1999). Opisanih je že več kot 200 vrst rodu *Candida*, vendar 95 % okužb, ki jih imenujemo kandidoze, povzročajo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* in *C. krusei* (Vollmer in sod., 2008). Med omenjenimi največ okužb povzroča *C. albicans* (kar 66% vseh kandidoz), a se opaža naraščanje incidence vrst, ki niso *albicans*, kot so *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* in *C. tropicalis* (Pfaller in Diekema, 2007).

Candida spp. so povsod prisotne (ubikvitarne) ter jih lahko najdemo v okolju, živalih, na predmetih in hrani. So del normalne človeške mikrobne flore kože, sluznic prebavil in spolovil. Iz ustne votline jih izoliramo pri približno 31 do 55 % zdravih oseb (Fidel in sod., 1999). Bolnišnične okužbe kandidoz lahko izvirajo iz hrane ali vode, kot tudi okolja. Nekateri, predvsem *C. parapsilosis*, se prenašajo tudi posredno z rokami preko zdravstvenih delavcev (19 %). So oportunistične glive in lahko povzročajo razne okužbe, a je kandidemija najresnejše obolenje (Richardson, 2005; Lass-Flörl, 2008). Okužbe se pojavijo, ko se spremeni normalna flora ali pa se zmanjša odpornost organizma (Matos, 2002a). Okužbe so večinoma endogenega izvora, lahko pa so tudi eksogene. Prenajajo se lahko horizontalno ali vertikalno iz človeka na človeka (pri porodu z matere na novorojenčka). Da pa se poveča možnost resnejših obolenj se mora povečati število glivnih celic, kar je posledica številnih dejavnikov tveganja. Populacije s tveganjem za okužbo so bolniki s presaditvijo organov, oboleli s HIV, hematološki bolniki, ljudje s posebno nego, pacienti po operativnih posegih in opeklinah, novorojenčki in nedonošenčki, rakavi bolniki

ter starostniki. Tveganje povečajo tudi urinski katetri, žilni vsadki, kortikosteroidi ter zdravila, ki zavirajo delovanje protonske črpalke (Lass-Florl, 2008; Richardon, 2005).

Glive nastopajo v dveh oblikah, torej so dimorfne. Najdemo jih v kvasni obliki, kot blastospore, tvorijo pa lahko tudi hife oziroma psevdohife, ki so po mnenju nekaterih mikologov invazivnejše pri okužbah. Za vzdrževanje kvasne oblike morajo imeti glive aktiven transkripcijski represor (Cole, 2011). Izjema je *C. glabrata*, ki ni dimorfna gliva in pri temperaturi 37 °C ne tvori hif (Fidel in sod., 1999). Na psevdomiceliju lahko tvorijo spore, ki jim pravimo klamidiospore ter jih lahko uporabimo pri identifikaciji med vrstami (Cole, 2011). Rastejo na večini gojišč, kot so Pagano-Levin agar, Sabouraudov agar, fosfomolibdatni agar, Nickersonov medij ter diferentni kromogeni CHROM agar (Sullivan in sod., 1996). Na trdnem gojišču zrastejo v 48 do 72 urah pri 37 °C kolonije premera 1 do 2 mm. Za razlikovanje med vrstami uporabljamo predvsem morfološke ter fiziološke lastnosti asimilacije in fermentacije različnih vrst sladkorjev, kot so komercialno dostopni biokemijski testi (Matos, 2002a; Fidel in sod., 1999). V direktnem mikroskopskem preparatu opazujemo predvsem psevdohife in blastospore, v kolikor jih barvamo z barvili po Gramu se obarvajo modro. Vrsto glive lahko klinično ugotavljamo na koruznem agarju po 24 urni inkubaciji. V kolikor so testi vprašljivi, opravimo še dodatne biokemijske teste (Matos, 2002a).

2.2 EPIDEMIOLOGIJA IN DEJAVNIKI TVEGANJA ZA NASTANEK OKUŽBE

Kandidoze so okužbe, ki jih povzročajo glive iz rodu *Candida*. Vse od leta 1990 je kandidoza najpogostejša invazivna glivična bolezen v Evropi, predvsem med imunsko oslabljenimi bolniki. Čeprav še vedno več kot 50 % okužb povzroča *C. albicans* je opazen porast okužb z vrstami, ki niso *albicans*, kot so *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* (Lass-Florl, 2008). Spremembe so opazili v študiji na Finskem, kjer so spremljali povzročitelje kandidoz med leti 1980 in 1990. Ugotovili so, da so se okužbe s *C. albicans* iz 90 % zmanjšale na 30 % medtem, ko so okužbe z drugimi *Candida* vrstami narasle, in sicer *C. glabrata* (iz 2 % na 26 %), *C. parapsilosis* (iz 10 % na 20 %) ter *C. tropicalis* (iz 2 % na 24 %) (Richardson, 2005). Med vzroki, ki so povzročili spremenjen spekter glivičnih

okužb, so navedli tudi povečano uporabo antimikotikov. V študiji, ki je zajemala večji del Evropskih držav, so ugotavljali incidenco kandidemij pod okriljem Evropske konfederacije medicinske mikologije (*angl.* European Confederation of Medical Micology, ECMM). Najvišja incidenca je bila 11 na 100.000 prebivalcev na Danskem (med letoma 2003 in 2004) medtem, ko je pri ostalih državah incidenca variirala med 1,4 in 4,9 (Lass-Florl, 2008). V Združenih državah Amerike je incidenca mnogo višja (22 do 24 na 100.000 prebivalcev na leto med leti 1996 in 2003). V literaturi je opisanih več kot 15 vrst različnih *Candida* spp., ki so povzročile invazivno kandidozo, a med njimi le pet (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) najpogostejših povzročča več kot 90 % vseh okužb (Pfaller in Diekema, 2007).

Dejavnike tveganja za nastanek kandidemije lahko delimo v dve skupini. V prvo skupino spadajo z gostiteljem povezani dejavniki tveganja, predvsem zdravila, ki zavirajo imunski sistem (kortikosteroidi, ciklosporin A). V drugo skupino pa z zdravljenjem povezani dejavniki, kot so žilni katetri, širokospektralni antibiotiki, operativni posegi (Richardson, 2005).

Glede na omenjene dejavnike tveganja poznamo dobro opredeljene skupine bolnikov, ki imajo večje tveganje za nastanek invazivnih glivičnih okužb. Številni med njimi imajo seveda kar več dejavnikov hkrati. Mednje sodijo bolniki, ki se zdravijo na intenzivnih enotah, prejemajo visoke odmerke zaviralcev imunskega sistema, parenteralno prehrano, širokospektralne antibiotike, imajo vstavljene žilne katetre, drene. Na teh oddelkih se pogosto zdravijo rakavi bolniki, bolniki po presaditvi krvotvornih matičnih celic in čvrstih organov, bolniki po večjih operacijah. Populacije z višjim tveganjem so zaradi fizioloških lastnosti tudi nosečnice pod 32 tedni nosečnosti, nedonošenčki z nizko porodno težo in starostniki. Med dejavnike tveganja sodijo še porušitev anatomskih pregrad (opekline, operativne rane), intubacija, septični šok, podaljšanje časa zdravljenja v bolnišnici, okužba z virusom HIV, prejetje citostatikov in obsežna obsevanja in nevtropenija. Pacienti z nevtropenijo so tisti z največjim tveganjem za okužbo, zato največkrat prejemajo preventivno zdravljenje z antimikotiki (Richardson, 2005).

2.3 PATOGENEZA IN VIRULENČNI DEJAVNIKI *Candida* spp

Potek klinične slike ob nastanku okužbe je odvisen od mesta vstopa, gostiteljeve obrambne sposobnosti, virulentnih dejavnikov ter količine mikrobov, ki povzročijo okužbo. Vstopno mesto so predvsem koža in sluznice. Kadar pride do poškodbe kože z operativnimi posegi, na vstopnih mestih raznih katetrov, opeklinah, lahko mikrobi vdrejo v poškodovan del kože, povzročijo lokalno okužbo ali pa vdrejo globlje v krvožilni sistem in se razširijo po telesu. Na sluznicah se lahko gliva na sicer normalno poseljenih predelih, ki so del normalne flore namnoži, kadar pride do hormonskih sprememb, daljših zdravljenj z antibiotiki ali obsevanj s kemoterapevtiki. Ob tem pride do nastanka obrambnega odgovora gostitelja, kar se kaže v obliki lokalnega vnetja. Pri patogenezi nastanka okužb so pomembni virulentni dejavniki povzročiteljev, ki so med predstavnicami rodu *Candida* najbolj raziskani pri vrsti *C. albicans*. Ta ima tudi največ virulentnih dejavnikov, kot so sposobnost vezave na endotelijske in epiteljske celice, sinteza proteinaze, tvorba hif in psevdohif, fenotipsko preklapljanje, sinteza fosfolipaze in antigenska modulacija (posledica psevdohifne oblike). Invazivnost in vezavo na celice tkiva povečajo hifna oblika, proteolitični encimi in modulacija protiteles (Fidel in sod., 1999; Richardson, 2005; Matos, 2002b).

Normalno sta koža in sluznica zaščiteni s kislim pH, encimi, sluzjo in drugimi antibakterijskimi izločki (keratin, mucin, kolagen). Sevi *C. albicans*, ki sintetizirajo proteinazo, so bolj virulentni; s testi so ugotovili, da najpogosteje izločajo aspartil proteinazo. Proteinazo izloča tudi *C. glabrata*. Encim jim omogoča razgradnjo proteinov na epiteliju in sluznicah. Ob vdoru v globlje predele razgrajujejo celo komplement, protitelesa in citokine. Proteinaza jim pomaga pri širjenju in invazivnosti v tkiva gostitelja, hkrati pa sproža vnetni odziv (Fidel in sod., 1999; Hazen in Howell, 2007).

Izredno pomemben virulentni dejavnik je vezava oziroma aderenza. Vezava verjetno pri *C. albicans* poteka preko celične površine, na njeno specifičnost pa lahko vplivajo okoljski dejavniki. *Candida albicans* ima zelo občutljivo celično površino na okoljske dejavnike v primerjavi s *C. glabrata*. Vendar so raziskave pokazale, da ima najvišjo afiniteto vezave na žilni endotelij *C. albicans*, najmanjšo pa *C. glabrata*. Tej sledijo *C. parapsilosis*, *C. kefyr*,

C. tropicalis in *C. krusei*. Ugotovili so tudi, da *C. albicans* verjetno sintetizira specifične adhezine na svoji površini, saj so celice prepoznane s strani monoklonskih protiteles (β_2 integrini), medtem ko te specifične povezave pri drugih vrstah niso zaznali (Fidel in sod., 1999).

Prisotnost fibronektina in laminih receptorjev na površini *C. albicans* jim verjetno omogoča vezavo na endotelijske in epiteljske celice. Najmočnejše se na epiteljske celice vežejo sevi, ki v okolje izločajo fosfolipaze, ki delujejo na membrane gostiteljevih celic. Cepijo estersko vez fosfolipidov in si tako olajšajo vstop v tkiva gostitelja. *Candida albicans* izloča fosfolipazo A in B ter lizofosfolipazo - transacilazo. Encime izločajo zgolj virulentni sevi, ki jim dajejo večjo patogenost medtem, ko komenzali teh encimov ne izločajo v svoje okolje (Fidel in sod., 1999; Hazen in Howell, 2007).

Biološki fenomen, ki so ga zaznali pri *C. albicans* predvsem *in vitro* in v nekaj primerih tudi *in vivo*, je fenotipsko preklapljanje. Domneva se, da so sevi, ki imajo to lastnost bolj virulentni (Fidel in sod., 1999).

Kolonizacija gliv je ključnega pomena, da lahko pride do okužbe. Večinoma so okužbe povzročene s *Candida* spp. notranjega izvora, endogeno povzročene. Kadar se poseljenost z neko vrsto poveča in je delno zavrt imunski sistem gostitelja, lahko gliva povzroči okužbo. Na povečano kolonizacijo s *C. albicans* vplivajo uporaba tretje generacije cefalosporinov, čas bolnišnične oskrbe, nizka porodna teža novorojenčka, uporaba venskih katetrov in parenteralne prehrane z lipidi. Okužbe z *C. parapsilosis* so pogosto zunanega izvora, eksogeno povzročene. Pomembna lastnost te vrste je, da lahko tvori biofilme, ki predstavljajo problem, saj se ta pritrjuje na površino medicinskih pripomočkov, katetrov in vsadkov, ki tako lahko postanejo vir za invazivno sistemsko okužbo (Lass-Florl, 2008; Richardson, 2005; Pfaller in Diekema, 2007).

Po prehodu v telo morajo mikrobi premestiti imunski odziv (Richardson, 2005). Pri okužbah s *C. albicans* so prva obrambna linija polimorfonuklearni levkociti, ki ščitijo organizem pred kandidemijo. V živalskih modelih so pokazali pomembnost T celic in celično posredovane imunosti, predvsem pri okužbah sluznic. Študije na miškah pa so pokazale razliko celičnega odziva tipa Th1 in Th2. Celični odziv tipa Th1, z izločanjem interlevkina 2, interferona gama in interlevkina 12, ščiti pred sistemskimi okužbami. Nasprotno pa celični odziv tipa Th2, s sproščanjem interlevkina 4, interlevkina 5,

interlevkina 10 ter protiteles razreda IgA in IgE, naredi organizem dovzetenjši za okužbo (Fidel in sod., 1999).

2.4 OKUŽBE, KI JIH POVZROČAJO VRSTE IZ RODU *Candida*

Koža in sluznice preprečujejo vdor mikroorganizmom v telo z izločanjem encimov, sluzi, drugimi antibakterijskimi izločki in kislim pH na površini. Te pregrade so lahko poškodovane ali pa se poruši normalno ravnovesje mikrobne flore, kar omogoča namnožitev gliv, lokalno vnetje ali celo vstop v krvni sistem in periferna, oddaljena tkiva in organe. Večina glivičnih okužb nima specifičnih znakov, kar otežuje prepoznavanje znakov in simptomov bolezni, hkrati pa otežuje zgodnjo diagnozo in nujno izkustveno zdravljenje (Richardson, 2005). Okužbe, ki jih povzročajo glive iz rodu *Candida* delimo na povrhnje okužbe, kronične mukokutane in sistemske kandidoze (Matos, 2002a).

2.4.1 Povrhnja kandidoza

Najpogostejša oblika je okužba sluznic, ki so vidne kot bele pege, imenovane soor. Bele pege se med seboj zlivajo, da nastanejo siraste psevdomembrane. Pri oralni kandidozi se bele pege pojavljajo na bukalni sluznici in nebu, sluznica v okolici pa je rdeča in otekla. Včasih se soor razvije pod zobno protezo ali pa spremlja dolgotrajno antibiotično terapijo. Te spremembe mehansko odstranimo, pod oblogami ostane vneto dno. Pri hujših oblikah okužbe, lahko opazimo bele pege tudi na jeziku, žrelu ali požiralniku in jih spremljajo simptomi, kot so težko požiranje in bolečine za prsnico. Orofaringealna kandidoza, ki je praviloma trdovratna in kronična, je pogosta pri obolelih z virusom HIV in so znak prehoda iz okužbe v AIDS bolezen. Vaginalna kandidoza je pogosta v času nosečnosti, večje tveganje za okužbo pa imajo ženske, ki prejemajo oralne kontraceptive in/ali imajo sladkorno bolezen (Matos, 2002a).

Kožna kandidoza se pojavi predvsem v predelih, ki so bolj vlažna, kot so pazduha, pod dojkami, v predelu dimelj. Pri majhnih otrocih lahko povzroča dermatitis pod plenici. Koža je na prizadetem predelu pordela, macerirana, hrapava na dotik, okolica pa se lušči.

Okužbe nohtov s *Candida* spp. so pogoste predvsem pri delavcih, ki so pogosto v stiku z vodo. Potek je počasen, običajno se začne na nohtnem korenu. Noht se zadebeli, postane hrapav in porumeni, koža v okolici nohta oteče, je boleča na dotik in živo rdeče barve. Glivično okužbo nohta imenujemo onihomikoza (Matos, 2002a).

2.4.2 Kronična mukokutana kandidoza

Kronična mukokutana kandidoza je heterogena skupina sindromov za katere so značilne kronične lezije kože nohtov in sluznice. Na prizadetih območjih ostanejo brazgotinaste ali bradavičaste spremembe, bolezen pa se pogosto prične v času otroštva in traja celo življenje. Pri tovrstnih bolnikih pogosto opazajo nepravilnosti v delovanju imunskega odziva, nekatere oblike so povezane s pomanjkanjem železa, druge spremljajo različne hormonske motnje (Matos, 2002a).

2.4.3 Sistemska kandidoza

Klinični potek in razvoj sistemske kandidoze je odvisen od velikosti inokuluma, virulence mikroorganizma in gostiteljevega imunskega stanja. Kadar glive vdrejo v krvni obtok, kar imenujemo kandidemija, se lahko razširijo po telesu. Poznamo kandidemijo brez prizadetosti notranjih organov, pogosto je povezana s kolonizacijo žilnih katetrov. V primeru da so prizadeti notranji organi pa ločimo akutno diseminirano obliko, ki jo spremljajo številni znaki prizadetosti notranjih organov z vnetnimi žarišči. Najpogosteje prizadenejo jetra (abscesi), ledvice (pielonefritis, cistitis, abscesi v parenhimu), vranico (abscesi), oči in osrednji živčni sistem (meningitis). Povzročajo lahko tudi pljučno kandidozo, endokarditis, miokarditis, perikarditis, endoftalmitis in peritonitis. Za kronično diseminirano obliko je značilno, da se pojavlja skoraj izključno pri dlje trajajoči motnji delovanja kostnega mozga in nevtropeniji. V večini primerov gre za bolnike s težkim potekom hematoloških malignih obolenj. Pri tej obliki iz hemokultur redko osamimo povzročitelje, prizadeta pa so najpogosteje jetra in vranica v obliki vnetnih žarišč. Imenujemo jo tudi hepatosplenična kandidoza. Do okužbe lahko pride preko poškodovane kože ali sluznic, pogost vir okužbe so zlasti prebavila, kjer so kandidate prisotne kot del

normalne flore in lahko preko poškodovane sluznice preidejo v krvni obtok (Matos, 2002a).

2.5 DIAGNOSTIKA KANDIDEMIJE POVZROČENE Z VRSTAMI RODU *Candida*

Invazivne kandidoze so povezane z visoko umrljivostjo in smrtnostjo. Pri diagnostiki sta zgodnje prepoznavanje povzročitelja bolezni ter zdravljenje ključna za izid okužbe. Klinična diagnostika je težavna, saj so znaki pri invazivnih glivičnih okužbah neznačilni. Zlati standard za postavitev diagnoze invazivne glivične bolezni je osamitev gliv iz normalno sterilnih mest. V pomoč so nam lahko tudi serološki testi, ki pa jih je potrebno pravilno interpretirati, saj so pogosto lažno pozitivni. Za mikrobiološko diagnostiko invazivne sistemske kandidoze se največkrat uporabljajo hemokulture. Občutljivost hemokultur je nizka in zato povzročitelja včasih ne zaznamo. Druga pomembna slabost pa je tudi dolgotrajnost postopka, ki vodi do relativno pozne detekcije in identifikacije povzročitelja. Zaradi omenjenih pomanjkljivosti se razvijajo novi diagnostični postopki, ki bi izboljšali občutljivost, specifičnost, predvsem pa tudi hitrost diagnostike invazivnih glivičnih okužb (Metwally in sod., 2008; Klingspor in Jalal, 2006; Lass-Flörl, 2008). Vrste, ki jih najpogosteje izoliramo pri obolelih z invazivno kandidozo so *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* in *C. glabrata* (Bougnoux in sod., 1999). Vzorce pridobimo iz normalno sterilnih mest, kot so kri, peritorealna tekočina, likvor (Vollmer in sod., 2008).

Pri okužbah krvnega obtoka z glivami rodu *Candida* spp je hitra diagnostika v začetnih fazah okužbe izrednega pomena. Diagnostika kandidemije s hemokulturami, ki so zlati standard, je lahko učinkovita, a se je izkazala za dolgotrajno metodo. Za pozitiven rezultat je potrebno vsaj dva dni, nasprotno pa je potrebnih sedem dni za negativen izvid. Hkrati je metoda slabo občutljiva, saj tudi do 50 % bolnikom, predvsem obolelih s kroničnimi kandidozami, povzročiteljev ne moremo dokazati, ker so koncentracije glivnih celic prenizke (Metwally, 2008; Preuner in Lion, 2009; Innings in sod., 2007). Hemokulture imajo nizko občutljivost predvsem v začetnih fazah okužbe, kar pa je pomembno za boljšo

prognozo in uspešno zdravljenje, lahko pa postanejo pozitivne v pozni fazi okužbe (Bougnoux in sod., 1999). Kri za hemokulture odvzamemo v sterilne komercialno pripravljene stekleničke s tekočim gojiščem z dodanimi snovmi, ki vežejo antibiotike in antimikotike ter tako olajšujejo rast bakterijam in glivam. Uporabljamo aerobna, anaerobna in mikološka gojišča. Poznamo dva avtomatizirana sistema s kontinuiranim nadzorom rasti mikroorganizmov v gojiščih, kolorimetrični BacT/ALERT (BioMerieux, Lyon, Francija) in fluorescentni BACTEC (Becton Dickinson, Sparks, ZDA). Sam nadzor lahko izvajamo avtomatsko ali elektronsko na približno 10 min dolge intervale. S študijami so ugotovili, da sta oba sistema izredno občutljiva (Ellepola in Morrison, 2005). Ko aparat javi pozitivno rast v steklenički se postopek nadaljuje z izdelavo mikroskopskega preparata. V primeru okužbe s kvasovkami opazujemo v preparatih pobarvanih po Gramu, modro vijolične brsteče celice in psevdomicelij. Hemokulturo nacepimo na mikološka gojišča. Po 24 do 48 urah zrastejo v obliki belih, krem kolonij, premera 1-2 mm. Pri sami identifikaciji ugotavljamo asimilacije in fermentacije različnih ogljikovih hidratov. Laboratoriji so razvili več različnih testov za hitro identifikacijo, med drugimi tudi komercialno dostopne API teste, kot so API 20C AUX (bioMerieux-Vitek, Hazelwood, Mo.), API Candida (bioMerieux, Pariz, Francija), Auxacolor (Sanofi Diagnostics Pasteur, Francija) in Uvi-Yeast-Tek kit (Remel Laboratories Lenexa, Kan.) (Ellepola in Morrison, 2005). V zadnjem času so razvili tudi sistemi za identifikacijo mikroorganizmov z masno spektrometrijo (*angl.* matrix-assisted laser desorption, MALDI) (Quites-Malero in sod., 2011).

2.5.1 Molekularna diagnostika

2.5.1.1 Vzorci za izolacijo DNK

Vzorci, ki jih lahko uporabimo za molekularno diagnostiko sistemskih glivičnih okužb so kri, serum, plazma, urin, vzorci spodnjih dihal in druga (Ellepola in Morrison, 2005). V literaturi so opisane nekatere raziskave, ki so želele ugotoviti, kateri vzorci bi bili primernejši za potrditev sistemske kandidoze. Izolacija glivne DNK se je v študijah izkazala boljše iz seruma in plazme, za kar so potrebovali 1 uro, v primerjavi z izolacijo iz celotne krvi, za kar so potrebovali 4 ure (Lau in sod., 2010). Krvni serum se je izkazal

boljši za diagnostiko sistemske kandidoze z verižno reakcijo s polimerazo (*angl.*, polimerase chain reaction, PCR) v primerjavi s celotno krvjo. V serumu imamo glivno DNK, celice pa odstranimo s centrifugiranjem. Nasprotno pa imamo pri krvnih vzorcih prisotne inhibitorje zaradi česar je potreben dodaten korak, ki podaljša izolacijski postopek. Po odstranitvi inhibitorjev je potrebno lizirati celično steno gliv, da pride do sprostitve DNK. Nasprotno pa imamo pri serumu zgolj prosto DNK (Bougnoux in sod., 1999). V študiji na Švedskem so izolirali glivno DNK različnih vrst *Candida* spp. iz različnih vzorcev: kri, likvor, bioptični vzorci, bronhoalveolarni izpirek, izločki iz pleure, traheje, izpljunek, gnojne tekočine, drenaže in urina (Klingspor in Jalal, 2006).

Prav tako je bilo opravljenih veliko študij, kjer so ugotavljali občutljivost izolacije glivne DNK iz polne krvi z EDTA ali iz usedline krvnih celic, ki so jo pridobili po centrifugiranju (Riemann in sod., 2007; Metwally in sod., 2008; Maarroufi in sod., 2003; Vollmer in sod., 2008; Lau in sod., 2010). Rezultati se med seboj precej razlikujejo, nekateri celo nasprotujejo, tako da za enkrat še ni jasnih smernic, kateri vzorci bi bili najprimernejši za molekularno diagnostiko in je odločitev prepuščena klinikom in mikrobiologom ter odvisna tudi od osnovne bolezni iz stanja bolnika.

2.5.1.2 Izolacija DNK

Največji izziv predstavlja sama izolacija DNK, od česar je odvisna občutljivost PCR reakcije. DNK mora biti čim bolj čista, izolacijski postopek pa časovno ugoden (Metwally in sod., 2008). Dobra izolacija je tista, ki nam da visoko koncentracijo DNK, odstrani čim več inhibitorjev in encimov (Tang in sod., 2005). Za pridobitev čiste izolirane DNK uporabljamo:

- Soli, detergente ali proteinazo K za lizo gostiteljskih eritrocitov in levkocitov
- DNaze za odstranitev gostiteljske DNK
- Encim zimolazo, s katerim ustvarimo sferoplaste
- RNaze za odstranitev RNK
- Natrijev in kalcijev acetat za precipitacijo proteinov in njihovo odstranitev
- Fenol, kloroform za čiščenje DNK

- Etanol za precipitacijo tarčne DNK (Epolla in Morrison, 2005).

Izolacija glivne DNK ima dve ključni omejitvi. Prva je težavna sprostitvev DNK iz celic, saj imajo glivne celice kompleksno zgrajeno celično steno, ki jim daje trdnost. Druga omejitev pa je dejstvo, da je koncentracija glivnih celic v tkivih ali krvi ob glivičnih okužbah lahko izredno nizka (do 1 CFU/ml) ali se glivne celice pojavljajo na teh mestih le občasno. Zaradi obojega je občutljivost postopka izolacije DNK ključna in predstavlja ozko grlo molekularne diagnostike sistemskih glivičnih okužb (Metwally in sod., 2008).

Izolacijo glivne DNK lahko izvedemo avtomatsko ali ročno z različnimi izolacijskimi kompleti. Avtomatsko izolacijo lahko izvajamo z več različnimi aparati, nekateri izmed njih so MagNa Pure compact (Compact; Roche Diagnostic, IN), NucliDend miniMAG (miniMAG; bioMerieux, Durham, NC), BioRobot EZ1 (EZ1; QIAGEN, Valencija, CA). Aparat, ki avtomatsko izolira DNK iz vzorcev vsebuje različne protokole. Pred začetkom postopka je potrebno določiti količino in volumen vzorca iz katerega delamo izolacijo DNK. Hkrati vsak aparat vsebuje kartuše s pufri in magnetnimi delci, držala s tipsi ter tubice za vzorce in izolate (Lee in sod., 2010). Prednost avtomatske izolacije je v krajšem rokovanju z vzorci, kar posledično pomeni manjšo verjetnost kontaminacije. Običajno je izolacijski postopek tudi krajši (Tang in sod., 2005; Knepp in sod., 2003; Lee in sod., 2010; Riemann in sod., 2007). Največjo nevarnost predstavljata predvsem možnost navzkrižne kontaminacije vzorcev, tekom izolacije z aerosoli in napake aparata (Knepp in sod., 2003).

Ročni izolacijski kompleti vsebujejo reagente, encime, pufre in navodila za izolacijo DNK. Referenčni komplet večine diagnostičnih laboratorijev je QIAamp Blood mini kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Poleg tega kompleta poznamo še več drugih:

- Qiagen kit/beads (Qiagen),
- MasterPure yeast DNK purification kit (Epicentre),
- Benzyl alcohol/guanidin hydrochloride (BAGH),
- Dr GenTle (Takara Bio),
- Yeast DNK extraction reagent (Y-DER) (Pierce Biotechnology),
- YeaStar genomic DNK kit (Zymo research).

Vsi kompleti so zasnovani za izolacijo glivne DNK iz kulture ali suspenzije gliv, hkrati pa so protokoli prilagojeni tudi za izolacijo glivne DNK iz krvi. Vsi kompleti poleg encimov, pufrov ter spiralnih pufrov vsebujejo tudi kolonce, ki služijo vezavi izolirane DNK od kjer v zadnji fazi postopka izolirano DNK speremo v pripravljene epruvetke (Metwally in sod., 2008).

Ročna izolacija je po mnenju nekaterih znanstvenikov bolj občutljiva in omogoča pridobitev večje koncentracije izolirane DNK. Vendar pri samem postopku obstaja večja možnost človeške napake in večja verjetnost kontaminacije vzorcev. Ročne izolacije so dolgotrajne, izvedbeno zahtevne in velikokrat vključujejo rokovanje z nevarnimi kemikalijami (Knepp in sod., 2003; Riemann in sod., 2007).

2.5.1.3 Preverjanje kvalitete in čistost izolirane DNK

Koncentracijo in čistost izolirane DNK iz vzorcev lahko zmerimo spektrofotometrično z UV absorbanco pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm. Pri valovni dolžini 260 nm absorbira valovno dolžino DNK, pri 280 nm absorbirajo proteini. Iz pridobljenega razmerja ugotavljamo čistost našega izolata. V kolikor je razmerje med vrednostjo 1,8 in 2 je izolirana DNK čista in vsebuje malo proteinskih primesi (Metwally in sod., 2008; Lee in sod., 2010). Široko-spektralni spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (PeqLab, Erlangen, Nemčija), nam avtomatsko hkrati izmeri optično gostoto pri 260 in 280 nm ter koncentracijo. Merjenje je izvedeno s strani dveh optičnih vlaken vgrajenih v podstavku s ksenon žarnico ter vzorčne roke s spektrometrom. Merjenje je opravljeno brez kivet ali kapilar v volumnu 1,5 μ l (Lee in sod., 2010).

2.5.1.4 Pomnoževanje glivne DNK z verižno reakcijo s polimerazo

Postopki, ki spadajo med molekularne teste delimo v dve večji skupini, in sicer med reakcije pomnoževanja nukleinskih kislin ter hibridizacijske metode. Smisel teh metod je v hitri in specifični identifikaciji v primerjavi s tradicionalnimi fenotipskimi metodami. Večinoma se v diagnostiki kandidemij uporablja predvsem PCR. Pred pričetkom reakcije PCR je potrebno določiti tarče za pomnoževanje. Oligonukleotidni začetniki so predvsem

odseki konzervativnih regij ribosomalne DNK, kot so 5.8S, 18S ter 28S hkrati pa tudi regije med njimi, ITS1 in ITS2 (Ellepola in Morrison, 2005). V nekaterih študijah omenjajo tudi možnost pomnoževanja genov, kot so aktin (ki nastopa v eni kopiji v genomu), gen za hitin sintazo, heat shock proteini (HSP 90), geni za lanosterol-14 α -dimetilazo, mitohondrijski gen za citokrom b, gen za CaMP65 (65-kDa monoprotein) in RNaza P RNA gen (Bougnoux in sod., 1999; Vollmer in sod., 2008).

PCR temelji na prileganju dveh oligonukleotidnih začetnikov ter vzpostavitvi optimalnih pogojev za njuno delovanje. Po pomnoževanju naredimo gelsko elektroforezo z ali brez restriksijskih encimov. Občutljivost gelčkov lahko povečamo s hibridizacijo, na primer po Southern-u na najlonsko membrano. Količino izolirane DNK po hibridizaciji zaznamo z radioaktivnimi ali kolorimetričnimi lovkami (Ellepola in Morrison, 2005). Poleg klasične PCR reakcije so že bile narejene študije za morebitno diagnostiko kandidemije z metodo pomnoževanje nukleinskih kislin s polimerazo z encimskim testom (*angl.* enzyme-linked immuno sorbent assay, PCR-ELISA oz. PCR-EIA), PCR v realnem času (*angl.* real-time PCR), multipleks PCR (*angl.* multiplex PCR), multipleks-tandem PCR (*angl.* multiplex-tandem PCR) in nested PCR. Tipizacijske metode, ki ločujejo posamezne seve znotraj ene vrste so pomnoževanje dolžin restriksijskih fragmentov (*angl.* amplified fragment length polymorphism, AFLP), naključno pomnoževanje odsekov DNK (*angl.* random amplified polymorphic DNA, RAPD), polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov (*angl.* restriction fragment length polymorphism, RFLP) enoverižni konformacijski polimorfizem (*angl.* Single-strand conformation polymorphism, SSCP) ter z zanko posredovano izotermično pomnoževanje DNK (*angl.* loop-mediated isothermal DNA amplification, LAMP). Izmed hibridizacijskih metod lahko izvajamo fluorescentno *in-situ* hibridizacijo (*angl.* fluorescent *in situ* hybridization, FISH), fluorescentno *in-situ* hibridizacijo z označenimi peptidi nukleinskih kislin (*angl.* fluorescent *in situ* hybridization – peptide nucleic acid, FISH-PNA), hibridizacija po Southern, hibridizacija s specifičnimi lovkami na mikrokroglice in DNK čipi (*angl.* DNA microarrays) (Ellepola in Morrison, 2005; Preuner in Lion, 2009; White in sod., 2005). Večinoma se izvajajo PCR metode, saj so hibridizacijske zahtevne za izvedbo in dolgotrajne (Inacio in sod., 2008). Metoda pomnoževanja sekvenc na osnovi nukleinskih kislin (*angl.* nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) je

izotermalni pomnoževalni proces, ki ne potrebuje temperaturnih ciklov za pomnoževanje nukleinskih kislin (Ellepola in Morrison, 2005; Zhao in sod., 2009). Analitske metode za ugotovitev pripadnosti organizma določeni izolirani DNK po PCR reakciji so DNK sekveniranje z avtomatizirano kapilarno elektroforezo, DNK sekveniranje in pirosekveniranje (Ellepola in Morrison, 2005; Preuner in Lion, 2009; White in sod., 2003). Po hibridizaciji, ki je nismo označili s fluorescentnimi lovkami, lahko izvedemo analizo t-RNK profilov (Sullivan in sod., 1996) (Preglednica 1).

Preglednica 1: Prikaz možnih molekularnih metod za diagnostiko kandidemij (Ellepola in Morrison, 2005; Preuner in Lion, 2009; White in sod., 2003; Inacio in sod., 2008; Sullivan in sod., 1996)

POMNOŽEVANJE NUKLEINSKIH KISLIN		
S POLIMERAZO	TIPIZACIJSKE METODE	
klasični PCR	AFLP	pomnoževanje dolžin restrikcijskih fragmentov
PCR-ELISA oz. PCR-EIA	RAPD	naključno pomnoževanje odsekov DNA
real-time PCR	RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov
multiplex PCR	SSCP	enoverižni konformacijski polimorfizem
multiplex-tandem PCR	LAMP	z zanko posredovano izpremično pomnoževanje
nested PCR		
HIBRIDIZACIJE		
florescentna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH)		
florescentna <i>in situ</i> hibridizacija s peptidnimi lovkami nukleinskih kislin (FISH-PNA)		
hibridizacija po Southernu		
hibridizacija s specifičnimi lovkami in mikrokroglicami		
DNK čipi		
DRUGE METODE POMNOŽEVANJA		
NASBA	pomnoževanje sekvenc na osnovi nukleinskih kislin	
ANALITSKE METODE		
POMNOŽEVANJE NK	HIBRIDIZACIJA	
sekvenciranje s kapilarno elektroforezo	analiza t-RNA profilov	
sekvenciranje		
pirosekvenciranje		

2.5.1.5 PCR v realnem času

Metoda za pridobivanje rezultatov v realnem času tekom reakcije je PCR v realnem času. Rezultate lahko spremljamo grafično, ko se DNK pomnožuje. Prednost te metode je

predvsem, da ni potrebna dodatna obdelava pomnožene DNK za analizo, kar zmanjša možnost kontaminacije. Poznamo tri različne principe delovanja PCRja v realnem času, in sicer TaqMan, Sybr green in molekularni označevalci (*angl.* molecular beacon).

TaqMan PCR v realnem času je fluorescentni test, ki uporablja označeno lovko. Na enem koncu je reporter, na drugem pa barvilo. Reakcija pomnoževanja s Taq polimerazo poteka s 5' proti 3' koncu. Polimeraza tekom pomnoževanja loči barvilo in reporter, ki odda fluorescenco, kar zaznamo kot signal (Ellepola in Morrison, 2005). Za identifikacijo kultiviranih kandid je hitra diagnostična metoda (White in sod., 2005). Metoda je visoko občutljiva in specifična pri pomnoževanju DNK (Metwally in sod., 2008).

Sybr green v realnem času pomnožuje DNK v steklenih kapilarah in sočasno meri fluorescenco pomnožkov z uporabo prenosa fluorescentne energije. Gre za uporabo dveh lovk. Prva je označena na 3' koncu s Cy5, druga pa na 5' koncu z barvilom SYBR. Ob vezavi lovke na pomnoženo DNK, Cy5 vzbudi aparat in energija, ki pri tem nastane se prenese na SYBR barvilo. Merimo količino fluorescence, ki nam jo da vrednost pomnožene DNK (Ellepola in Morrison, 2005). Lovka fluorescira, kadar je vezana na pomnoženo DNK. Fluorescenca se povečuje z vsakim krogom reakcije, kar lahko spremljamo preko računalnika (White in sod., 2003).

Molekularni označevalci so kratka zaporedja nukleotidov, ki so komplementarna želenemu zaporedju ter imajo na 5' koncu vezano fluorescentno barvilo. Oligonukleotidni začetniki pomnožujejo DNK, na katere se komplementarno vežejo molekularni označevalci. Zaporedje nukleotidov mora popolnoma nalegati, saj v nasprotnem primeru po vezavi barvilo na označevalcu ne spremeni konformacijske strukture in ne oddaja fluorescence. Tekom reakcije se povečuje tudi število produktov vezanih z molekularnimi označevalci, kar zaznamo s povišanjem fluorescence (Tyagi in sod., 2000).

Kadar želimo povečati učinkovitost PCR reakcije in zmanjšati stroške analize uporabimo multiplex PCR. Gre za uporabo več oligonukleotidnih začetnikov v eni reakciji. Oblikovanje začetnikov je ključno, predvsem da so temperature prileganja čim bližje temperaturnemu optimumu reakcije. Hkrati je pomembno, da vsak začetnik naredi različno dolge produkte, da jih lahko ločimo in rezultate analiziramo. Problem tovrstne metode je predvsem v potencialnih interferencah med začetniki (Singh in sod., 2006).

2.5.1.6 SmartCycler PCR

Aparati za PCR v realnem času so opremljeni s fluorescentnimi detektorji in programi sposobnimi oceniti cikel prehoda preko mejne vrednosti (*angl.* critical treshold, CT). To je cikel, pri katerem je fluorescenca višja od fluorescence ozadja, kar nam da pozitiven rezultat (Jothikumar in sod., 2009).

SmartCycler je kvantitativni PCR v realnem času, ki je preprost, hiter, dobro občutljiv in specifičen (Belanger in sod., 2002). Ima sposobnost pomnoževanja RNK in DNK zaporedij ter je uporaben za diagnostične teste, ki zahtevajo avtomatično, ponovljivo in natančno metodo, hkrati pa lahko izvajamo več različnih protokolov hkrati. Je multiplex PCR, saj lahko v eni reakcijski tubici uporabimo začetne oligonukleotide in fluorescentno označene lovke. V vsako reakcijsko mesto vstavimo polipropilensko tubico volumna 25 μ l, ki je ne odpiramo po končani reakciji, kar preprečuje možnost kontaminacije. Princip delovanja temelji na TaqMan PCR, kjer imamo vezane sonde s fluorescentnimi barvili (Cepheid, 2011). Tehnologija temelji na uporabi dveh oligonukleotidnih začetnikov ter uporabo fluorescentne lovke, ki se veže na začetnika. Po uspešni vezavi na tarčo, polimeraza tekom pomnoževanja razreže vezano sondo in s tem loči vezano fluorescentno barvilo. Ta zasveti in odda signal, ki se veča tekom časa reakcije. Prisotnost produktov je zaznana s strani signala fluorescence, ki preide CT vrednost (Wortmann in sod., 2007). Emisijski signal zazna optični sistem z diodami CED, silikonskim fotodetektorjem in filtri z različnimi spektričnimi barvili. Ima 4 optične kanale, s katerih vsakič zbere podatke (Preglednica 2).

Preglednica 2: Prikaz kanalov za posamezna barvila, njihov vrh absorbance in emisije v nm na SmartCycler aparatu (Cepheid, 2011)

KANAL	1	2	3	4
BARVILO	FAM interkalirajoče	Cy3, TET Alexa 532	TxR	Cy5 Alexa 647
ABSORBANCA (nm)	450 - 495	500 - 550	565 - 590	630 - 650
EMISIJSKI VRH (nm)	510 - 527	565 - 590	606 - 650	670 - 750

Sama tehnika izolacije ne more ločiti resnično negativnega rezultata od lažno negativnega, če imamo v reakcijski mešanici prisotne inhibitorje. Ti so lahko prisotni po izolaciji iz

kliničnih vzorcev (npr. hemoglobin), okolijskih vzorcev (npr. kisline) in kemikalije uporabljene tekom izolacije (etanol, detergenti, kaotropični agensi). Zanesljivost diagnostičnih testov lahko povečamo z dodatkom pozitivne interne kontrole, ki nam pokaže prisotnost inhibitorjev PCR. Pozitivna interna kontrola (IPK) se pomnožuje tekom reakcije ter se veže na inhibitorje, le oddaja svetlobo pri drugi valovni dolžini. Interne kontrole so predvsem plazmidne z zaporedjem podobnim pomnoženemu, le da se razlikuje zaporedje za vezavo sonde (Jothikumar in sod., 2009).

2.6 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽB Z GLIVAMI RODU *Candida*

Okužbe s *Canidida* spp. zdravimo z antimikotiki. Za izid je ključnega pomena zgodnje zdravljenje in preventiva pri skupinah ljudi z visokim tveganjem za nastanek okužbe. S zakasnelim začetkom zdravljenja narašča umrljivost, zato pri ogroženih skupinah, izvajamo preventivno zdravljenje (Lass-Florl, 2008). Smrtnost glivičnih okužb je najvišja pri obolelih s hematološkimi malignimi obolenji (41,2 %) in starostnikih nad 70 let (41 %), sledijo bolniki po operacijah (38,5 %), okuženi z več kot eno vrsto rodu *Candida* (40 %) ter okuženi s *C. glabrata* (38 %) (Klingspor in Jalal, 2006).

Sama odločitev glede izbire izkustvenega zdravila ob sumu ali potrjeni okužbi s *Candida* spp. je odvisna od teže klinične slike bolnika, njegovega predhodnega zdravljenja z antimikotiki, osnovnih bolezni, interakcije med zdravili (če se bolnik zdravi še za katero drugo bolezen), in poznavanja lokalne epidemiologije na oddelku oziroma ustanovi. (Lass-Florl, 2008). Za zdravljenje kandidoz se lahko uporabljajo antimikotiki iz skupin polienov, azolov in ehinokokadinov (Pfaller in Diekema, 2007). Med polieni uporabljamo amfotericin B kot izbirno zdravilo za zdravljenje sistemskih kandidoz. S svojo vezavo na ergosterol v membrani gliv spremeni njeno strukturno lastnost, kar vodi v nastanek por preko katerih celica izgublja ione in makromolekule. Nekateri amfotericin B kombinirajo s flucitozinom (Matos, 2002b). Zaradi številnih težkih stranskih učinkov zdravljenja s tem antimikotikom se za amfotericin B odločijo v primerih težko potekajočih glivičnih okužb, kjer je povzročitelj še neznan, ali je bolnik predhodno prejemal antimikotično preventivno zdravljenje z zdravili iz skupine azolov. Največkrat kandidoze zdravijo z azoli. Poznamo

flukonazol, itrakonazol, vorikonazol in posakonazol (Pfaller in Diekema, 2007). Delujejo inhibitorno na encim citokrom P-450, ki sodeluje pri demetilaciji lanosterola v ergosterol. Daleč najpogosteje se uporablja flukonazol, ki ima v primerjavi z amfotericinom B manj stranskih učinkov (Matos, 2002b). Ostali trije azolni antimikotiki (itrakonazol, vorikonazol in posakonazol) so širokospektralni. Nekateri izmed njih so novejši, kot je posakonazol, ali so rezervirani kot izbirno zdravilo za zdravljenje drugih glivičnih okužb, kot je vorikonazol za zdravljenje invazivne aspergiloze. Tretja skupina antimikotikov so ehinokokadini, ki inhibirajo sintezo 1,3- β -D-glukana, ki je del celične stene gliv. Mednje spadajo anidulafungin, carprofungin in mikafungin. Uporabljamo jih predvsem pri okužbah z vrstami rodu *Candida*, ki so odporne na azole ali v primerih, ko z azoli ne dosežemo ustreznega učinka zdravljenja (Pfaller in Diekema, 2007).

Pri skupinah ljudi, ki so dovzetnejši za okužbe (imunsko oslabljeni bolniki) je pomembno preventivno zdravljenje, ki ima namen, da prepreči nastanek okužbe. (Bougnoux in sod., 1999). Zdravljenje izvajamo predvsem s flukonazolom pri nevtropeničnih bolnikih s hematološkimi malignimi obolenji, ki se zdravijo po presaditvi krvotvornih matičnih celic (okužbe predvsem s *C. krusei*, *C. glabrata* in *C. parapsilosis*) (Pfaller in Dekema, 2007). Pomembno je, da preventivno zdravljenje prejema le skupine bolnikov, za katere je potrjeno, da pripomore pozitivno k izidu zdravljenja, saj antimikotično zdravljenje prinaša s seboj tudi številne neugodne toksične, stranske učinke, omogoča hitrejši razvoj odpornosti gliv in ne nazadnje tudi vodi do nepotrebnih stroškov zdravljenja (Bougnoux in sod., 1999).

Candida albicans je bolj virulentna v primerjavi z ostalimi vrstami zaradi številnih virulentnih dejavnikov ter invazivne patogeneze, sama pa redko razvije odpornost proti antimikotikom (Pfaller in Diekema, 2007). Proti flukonazolu je naravno odporna *C. krusei*. Proti amfotericin B pa je lahko naravno odporna *C. lusitaniae*. Za vrsto *C. glabrata* je značilno, da ima višje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za flukonazol, kakor tudi da ob zdravljenju s tem antimikotikom hitreje postane nanj odporna. Mehanizem odpornosti je najpogosteje povezan s povečano ekspresijo črpalk, ki aktivno izčrpavajo antimikotik iz glivnih celic. Ker so črpalke lahko nespecifične, je odpornost proti flukonazolu pogosto povezana z navzkrižno odpornostjo tudi proti drugim azolom (Pfaller in Diekema, 2007). *Candida dubliniensis* hitro razvije odpornost proti flukonazolu ob

daljšem zdravljenju. *Candida parapsilosis* in *C. guilliermondii* imata višje vrednosti MIK za ehinokokandine (Ellepola in Morrison, 2005).

Poleg antimikotičnega preventivnega zdravljenja, predvsem s flukonazolom, je za preprečevanje okužb pomembna tudi skrbna bolnišnična higiena. Zdravstveni delavci naj redno razkužujejo roke in skrbijo za druge sanitarno higienske ukrepe na oddelkih bolnišnic. Pomembno je tudi redno negovanje, nadzor in menjavanje žilnih ter urinskih katetrov, ki povečujejo možnosti nastanka okužbe. Za zgodnje in uspešnejše zdravljenje je ključnega pomena hitra in zanesljiva diagnostika ter prepoznavna povzročitelja okužbe (Pfaller in Dekema, 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili referenčna seva *C. albicans* (ATCC 90028) in *C. glabrata* (ATCC 2001), ki smo ju predhodno gojili na trdnem gojišču po Sabouraudu (SDA; Oxoid). Iz vsakega seva smo iz suspenzije celic pripravili koncentracijo 0,5 McFarladna v NaCl in naredili redčitveno vrsto v vodnem mediju in v krvi. Koncentracije glivnih celic v vodnem mediju so znašale od 10^6 CFU/ml do 10^0 CFU/ml. Kri smo odvzeli v epruvete z EDTA (Greiner Bio-One) zdravim prostovoljcem. Vanjo smo dodali suspenzijo ustrezne koncentracije glivnih celic, da smo dobili koncentracijski gradient od 10^4 CFU/ml do 10^1 CFU/ml, ter 5, 2'5 in 1 CFU/ml. Celotni volumen posameznega vzorca je znašal 1 ml.

Naredili smo tudi primerjavo med celotno krvjo, usedlino in plazmo krvnih vzorcev, koncentracij za *C. albicans* 10^4 , 10^2 ter 10^1 CFU/ml, medtem ko smo za *C. glabrata* izvedli koncentraciji 10^2 ter 10^1 CFU/ml. Za padajoče koncentracije gliv v vodnem mediju smo celotni postopek izolacije izvedli v treh vzporednih redčitvenih vrstah, za obe vrsti. Izolacije iz krvi koncentracij 10^4 CFU/ml do 10^1 CFU/ml smo izvedli v dveh ponovitvah, 5, 2'5 in 1 CFU/ml pa v eni ponovitvi. Kliničnih vzorcev v raziskavo nismo vključili.

3.2 METODE DELA

Redčitveno vrsto vzorcev z ustrezno koncentracijo glivnih celic v vodi, smo preverili na kromogenem gojišču za glive, CHROM diferencialnem gojišču (bioMereux, Pariz, Francija), ki smo ga inkubirali 24 ur na 37 °C.

Iz redčitvene vrste glivnih celic smo izolirali glivno DNK z eno avtomatsko ter dvema ročnima metodama. Avtomatsko izolacijo smo izvedli z izolacijskim kompletom MagNAPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit 1 (MagNA Pure) na MagNA Pure Compact aparatu (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Nemčija), ročni pa z metodo

QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) ter YeaStar genomic DNK kit (Zymo Research, Irvine, CA).

3.2.1 Ročna izolacija z referenčnim kompletom (Qiagen)

Postopek izolacije smo izvedli po navodilih proizvajalca. Redčitveni vrsti glivnih celic v vodnem mediju, smo po začetnem centrifugiranju in odstranitvi supernatanta dodali sorbitolni pufer (pH = 7,5), litikazo za razgradnjo celične stene gliv, predvsem glukana in merkaptoetanol za redukcijo disulfidnih vezi. Po inkubaciji 30 minut na 30 °C smo dodali ATL pufer in proteinazo K za razgradnjo proteinov in pustili na 55 °C 15 minut. Po dodatku AL pufru in 10 minutni inkubaciji na 70 °C smo dodali absolutni etanol za denaturacijo DNK. Sledilo je spiranje v koloncah s pufroma AW1 in AW2. Izolirano DNK smo sprali in shranili 1,5 ml epruvetke v AE pufru na 4 °C do reakcije s PCR.

Redčitveno vrsto s krvjo smo najprej obdelali s pufrom za lizo eritrocitov (red cell lysis buffer, RCLB). Epruvete krvi z EDTA s sevi ustreznih koncentracij smo trikrat centrifugirati z RCBL pufrom, in sicer 5 minut na 8.000 rpm, supernatant smo vsakič zavrgli in dodali svež RCBL. Po zadnjem centrifugiranju smo dodali 900 µl RCBL in prenesli v 1,5 ml epruvetke. Po dodatku proteinaze K v RCBL pufer smo inkubirali 45 minut na 65 °C za optimalno delovanje encima. Nadaljnji postopek izolacije smo opravili enako kot z izolati v vodnem mediju.



Slika 1: Izolacijski komplet Qiagen Blood Mini kit

3.2.2 Ročna izolacija z YeaStar izolacijskim kompletom (YeaStar)

Tako iz vodnega medija kot iz krvi je postopek izolacije glivne DNK potekal protokolu I iz navodil proizvajalca.

Po začetnem centrifugiranju in odstranitvi supernatanta smo dodali YD digestion pufer in R-Zimolazo ter inkubirali na 37 °C eno uro. Po dodatku YD lizis pufra in kloroforma smo očistili DNK v koloncah s DNK spiralnim pufrom. Pri vzorcih smo prenesli zgolj zgornjo fazo, nad kloroformom. DNK smo sprali z vodo v 1,5 ml označene epruvice in jo shranili na 4 °C do analize s PCR oz. za daljše obdobje na -20 °C. Pri vzorcih krvi smo morali postopek spiranja skozi kolonce večkrat ponoviti, saj se DNK s prvim centrifugiranjem ni sprala preko membrane.



Slika 2: Izolacijski komplet YeaStar

3.2.3 Avtomatska izolacija z MagNA Pure Compact izolacijskim kompletom (MagNA Pure)

Avtomatsko izolacijo smo izvedli na aparatu MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics) s predhodno predpripravo vzorcev.

Redčene vzorce v vodnem mediju smo prenesli v 1,5 ml tubice z navojem, ki so vsebovale keramične kroglice (Roche, GmbH, Mannheim, Nemčija) in stresali 15 minut. Po centrifugiranju 5 minut na 13.200 obratih smo odstranili supernatant. Po dodatku 180 µl pufra za lizo bakterijskih celic (*angl.* bacterial lysis buffer, BLB) (Roche, GmbH, Mannheim, Nemčija) in 20 µl proteinaze K (Roche, GmbH, Mannheim, Nemčija) smo

vzorci inkubirali 15 minut na 65 °C s 550 rpm stresanja. Nato smo jih prenesli na 95 °C za 10 minut s 300 rpm stresanja in jih pred avtomatsko izolacijo ohladili na 4 °C za 5 minut.

Redčitveno vrsto s krvjo smo izolirali po nekoliko spremenjenem protokolu. Sprva smo vzorce v 1,5 ml epruvtkah s keramičnimi kroglicami stresali 15 minut. Nato smo vzorce centrifugirali 2 minuti na 8.000 obratih ter 1 minuto na 13.200 obratih. Po odstranitvi supernatanta smo dodali 180 µl BLB pufra ter 20 µl proteinaze K. Po inkubaciji na 65 °C za 15 minut smo v vsak vzorec dodali suspenzijo DTT končne koncentracije 0,15 µM in premešali na vorteksu za 2 sekundi. Inkubirali smo jih 30 minut na 37 °C s 300 rpm stresanja ter jih vsakih 10 minut stresali za 15 sekund. Po 10 minutni inkubaciji na 95 °C smo vzorce kot pri izolaciji v vodnem mediju ohladili na 4 °C.

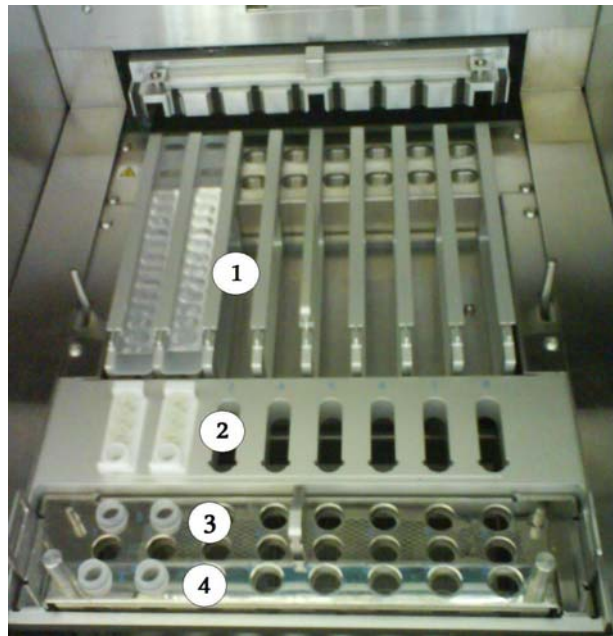
Vzorci krvi pri katerih smo izvedli primerjavo izolacije iz cele krvi, usedline in plazme smo pred celotnim postopkom dodatno obdelali. V epruveto z 3,6 ml krvi smo dodali 400 µl rečenega seva v vodnem mediju. Po 15 sekundnem vorteksiranju epruvete z ustrezno koncentracijo seva smo odvzeli 1 ml krvi in jo prenesli v 1,5 ml označeno epruvetko s keramičnimi kroglicami. Preostanek krvi smo centrifugirali 5 minut na 4.000 obratih, da smo dobili dve fazi. Po 1 ml zgornje faze, plazma, in spodnje faze, usedlina krvnih celic, smo prenesli v 1,5 ml epruvetke s keramičnimi kroglicami in nadaljevali postopek izolacije po protokolu za krvne vzorce.

Po predpripravi vzorcev smo izolacijo izvedli na avtomatu MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Nemčija) po protokolu Bacterial_protocol_V1_3 izolacije DNK. Reagenti za posamezni vzorec se nahajajo v kartušah, kjer vsaka luknjica vsebuje določene reagente, kot so magnetni delci, pufer za lizo celic, spiralni pufer in elucijski pufer. V 2 ml tubice za vzorce smo dodali 400 µl predhodno obdelanega vzorca ter dobili 100 µl izolirane DNK v pufru v 2 ml elucijskih tubicah z navojem.

Reagente in vzorce smo naložili v stojala na robotu, kot je prikazano na sliki 3:

1. vrsta: Reagenti v kartušah
2. vrsta: Držala za tipse in tipsi
3. vrsta: 2 ml tubice v katerih se nahajajo vzorci

4. vrsta: Elucijske epruvetke volumna 2 ml



Slika 3: Delovna miza MagNA Pure Compact

(Legenda: 1. reagenti v kartušah; 2. držala za tipse in tipsi; 3. 2ml tubice z vzorci; 4. elucijske epruvetke volumna 2 ml)

Po končani izolaciji, ki je potekala 27 minut, smo izolate pospravili v hladilnik do nadaljnje analize s PCR.

3.2.4 Pomnoževanje in analiza izolirane DNK

Vzorke smo vzeli iz hladilnika in jih pustili na sobni temperaturi. Medtem smo si pripravili mešanico za PCR (Preglednica 3).

Preglednica 3: Prikaz količine mešanice za PCR za en vzorec za *C. albicans* in *C. glabrata*

	volumen (μl)
Platinum qPCR SuperMix-UDG	12,5
lovka <i>C. albicans</i> ali <i>C. glabrata</i>	0,75
voda	6,75
MMX skupaj	20
vzorec (DNK)	5
skupaj	25

Preglednica 4: Prikaz vrstno specifičnih oligonukleotidnih začetnikov in sond za *C. albicans* in *C. glabrata*

<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> -F
	<i>C. albicans</i> -R
	<i>C. albicans</i> -TGprobe FAM
<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> -F
	<i>C. glabrata</i> -R
	<i>C. glabrata</i> -TGprobe TxR

Za PCR reakcijo smo uporabili 2 oligonukleotidna začetnika, in sicer enega, ki je pomnoževal naprej (*angl.* front; F) ter drugega, ki je pomnoževal v drugo smer (*angl.* rear; R). V reakcijsko mešanico smo dodali tudi lovki (*angl.* probe) s fluorescenčnim označevalcem. Za *C. albicans* smo uporabili barvilo FAM, za *C. glabrato* pa TxR (Preglednica 4).

V hladilni blok smo postavili tubice za SmartCycler II aparat ter odpipetirali v vsako 20 μl PCR reagenčne mešanice. V tubico z negativno kontrolo smo dodali še 5 μl vode, v tubico s pozitivno kontrolo pa smo dodali 5 μl predhodno izolirane DNK glive kvasovke rodu *C. albicans* oz *C. glabrata*. V vse ostale smo dodali vzorce do končnega volumna 25 μl. Vsak vzorec smo v treh ponovitvah naložili v aparat, hkrati pa smo v vsakem sklopu pomnoževanja dodali pozitivno in negativno kontrolo.



Slika 4: SmartCycler 25 µl tubica

Reakcijsko mešanico smo naložili v aparat SmartCycler II (Cepheid, Sunnyvale, CA) po programu *Candida* 1. Temperature in časi po katerih poteka reakcija so bili sledeči:

Temperaturni cikli:

- 50 °C 2 min
 - 95 °C 2 min
 - 95 °C 15 sek
 - 60 °C 90 sek
- } 45 ciklov

V prvem delu reakcije se je dvovijačna DNK razprla v enoverižno, kjer je potem potekel cikel pomnoževanja. Najprej so se na ločeno enojno vijačnico DNK vezali oligonukleotidni začetniki. V naslednji stopnji je sledilo pomnoževanje s polimerazo. Po končanem pomnoževanju se je polimeraza odcepila, dobili smo produkte, komplementarne dvovijačne odseke DNK. Tako je poteklo vseh 45 ciklov pomnoževanja.

Rezultate smo odčitali na podlagi prehoda krivulje preko mejne vrednosti (critical treshold – CT). To je vrednost za evaluacijo optičnega signala. Kadar primarna krivulja seka CT vrednost ali je derivat nad njeno vrednostjo, je to pozitiven rezultat. V nasprotnem primeru, kadar je vrednost pod CT je negativni rezultat. Oligonukleotidni začetniki so pomnoževali gene ITS 1 in ITS 2 regije. Barvila, ki so bila vezana na komplementarno sondo so bila, za *C. albicans* FAM ter za *C. glabrata* TxR.

Jarc A. Primerjava treh metod za izolacijo DNK kvasovk rodu *Candida*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologija, 2011



Slika 5: SmartCycler II aparat z računalnikom, centrifugo in hladnim blokom

4 REZULTATI

Rezultati izolacij, ki smo jih izvedli po treh različnih protokolih in v dveh različnih medijih so se med seboj razlikovali. V vodnem mediju smo izvedli vse tri izolacije v treh ponovitvah in iz vsakega izoliranega vzorca izvedli tri reakcije pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Celokupno število reakcij za posamezno koncentracijo je bilo devet. Poleg navedene CT vrednosti pri posamezni koncentraciji in vrsti so navedeni deleži pozitivnih rezultatov reakcij za navedeno koncentracijo in vrsto v vodnem mediju (Preglednica 5).

Preglednica 5: Povprečne vrednosti CT in delež pozitivnih reakcij izolacije glivne DNK za *C. albicans* in *C. glabrata* v vodnem mediju za koncentracije 10^6 do 10^0 CFU/ml

VODA		10^6 CFU/ml		10^5 CFU/ml		10^4 CFU/ml		10^3 CFU/ml		10^2 CFU/ml		10^1 CFU/ml		10^0 CFU/ml	
		CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)
<i>Candida albicans</i>	MagNA Pure	22,7	100	26,3	100	29,6	66,7	33,1	77,8	35,1	22,2	40,9	11,1	0	0
	YeaStar	15,5	88,9	19,0	100	23,6	100	33,1	66,7	0	0	0	0	0	0
	QIAgen	19,0	100	22,8	100	26,3	88,9	30,2	55,6	33,8	22,2	36,5	22,2	0	0
<i>Candida glabrata</i>	MagNA Pure	18,8	100	22,1	100	25,4	100	28,8	88,9	32,6	77,8	36,2	44,4	0	0
	YeaStar	18,5	22,2	20,0	33,3	23,3	44,4	26,2	22,2	0	0	35,3	33,3	0	0
	QIAgen	15,5	100	19,3	100	22,0	100	25,6	100	29,4	55,6	31,5	66,7	35,0	44,4

Pri vzorcih iz krvi z EDTA smo izvedli koncentracije 10^4 do 10^1 CFU/ml v dveh ponovitvah (Preglednica 6).

Preglednica 6: Povprečne vrednosti CT in delež pozitivnih reakcij izolacije glivne DNK za *C. albicans* in *C. glabrata* iz krvi z EDTA za koncentracije 10^4 do 10^1 CFU/ml

KRI		10^4 CFU/ml		10^3 CFU/ml		10^2 CFU/ml		10^1 CFU/ml	
		CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)
<i>Candida albicans</i>	MagNA Pure	26,0	100	30,3	100	33,5	100	35,4	16,7
	YeaStar	0	0	0	0	0	0	0	0
	QIAgen	30,2	100	19,8	33,3	35,1	66,7	37,0	50,0
<i>Candida glabrata</i>	MagNA Pure	23,9	100	28,6	100	32,5	100	35,8	83,3
	YeaStar	39,4	50,0	39,7	33,3	0	0	0	0
	QIAgen	25,7	100	29,5	100	33,3	83,3	37,6	50,0

Na podlagi primerjave rezultatov CT in občutljivosti izolacij DNA iz krvi z EDTA smo z aparaturo MagNA Pure Compact izvedli še izolacije DNA nižjih koncentracij (Preglednica 7).

Preglednica 7: Povprečne vrednosti CT in delež pozitivnih reakcij izolacije glivne DNK za *C. albicans* in *C. glabrata* iz krvi z EDTA z MagNA Pure izolacijo za koncentracije 5 CFU/ml, 2,5 CFU/ml in 1 CFU/ml

celotna kri - MagNA Pure	5 CFU /ml		2,5 CFU /ml		1 CFU /ml	
	CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)
<i>C. albicans</i>	36,5	33,3	37,5	100	39,6	33,3
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0	0	0

Zanimalo nas je tudi, kateri del krvi EDTA je najboljši za nadaljnjo obdelavo z MagNA Pure in vsebuje največ glivnih celic. Rezultati prikazujejo CT vrednosti in delež pozitivnih CT vrednosti za obe testirani vrsti iz celotne krvi, plazme in usedline. Postopek smo izvedli v eni ponovitvi, in sicer v koncentracijah 10^4 , 10^2 in 10^1 CFU/ml za *C. albicans* in 10^2 in 10^1 CFU/ml za *C. glabrata* (Preglednica 8).

Jarc A. Primerjava treh metod za izolacijo DNK kvasovk rodu *Candida*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologija, 2011

Preglednica 8: Povprečne vrednosti CT in delež pozitivnih reakcij izolacije glivne DNK za *C. albicans* in *C. glabrata* iz celotne krvi z EDTA, usedline in plazme z MagNA Pure izolacijo za koncentracije 10^4 , 10^2 in 10^1 CFU/ml

KRI - MagNa Pure		10^4 CFU /ml		10^2 CFU /ml		10^1 CFU /ml	
		CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)	CT	poz CT (%)
<i>Candida albicans</i>	celotna kri	25,8	100	32,0	100	37,4	100
	usedlina	26,5	100	32,3	100	0	0
	plazma	42,0	66,7	0	0	41,0	33,3
<i>Candida glabrata</i>	celotna kri	\	\	33,0	100	0	0
	usedlina	\	\	35,3	66,7	0	0
	plazma	\	\	0	0	0	0

S primerjavo vseh treh izolacijskih metod se je avtomatska izkazala za najhitrejšo, za izvedbo potrebuje najmanj ročnega dela in ne zahteva rokovanja z nevarnimi kemikalijami. Izolacija z MagNA Pure je visoko občutljiva in ima tudi manjšo možnost človeške napake (Preglednica 9).

Preglednica 9: Primerjava izolacijskih kompletov s časom obdelave in občutljivostjo za *C. albicans* in *C. glabrata*

izolacijski komplet	občutljivost	čas obdelave
QIAgen	1 CFU/ml	2h 30 min
YeaStar	1000 CFU/ml	1h 10 min
MagNA Pure	1 CFU/ml	1h 45 min

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Dokazovanje gliv rodu *Candida*, ki povzročajo kandidemijo, je zaradi nizke koncentracije prisotnosti glivnih celic v periferni krvi zahtevno. Hemokultura, ki še vedno velja za zlati standard mikrobiološke diagnostike sistemskih glivičnih okužb je slabo občutljiva metoda, poleg tega pa je tudi dolgotrajna. To je slabo, zaradi možne prepozne odločitve za uvedbo antimikotičnega zdravljenja. Z razvojem molekularnih tehnik se odpirajo nove možnosti za predvsem hitrejšo diagnostiko teh težko potekajočih okužb. Metode so visoko specifične, ponovljive in enostavne za izvedbo (Preuner in Lion, 2009). Kljub visoki občutljivosti metod, je dokazovanje glivičnih okužb še vedno zahtevno, saj je lahko koncentracija glivnih celic v krvi pod 1 CFU/ml in se v njej pojavljajo le občasno (Metwally in sod., 2008; Preuner in Lion, 2009). Večji problem pri molekularni diagnostiki sistemskih glivičnih okužb predstavlja pridobitev izolirane DNK iz kliničnih vzorcev. Izolirana DNK mora biti čista, izolacija pa hitra, kljub majhni količini DNK (Metwally in sod., 2008).

Več študij je bilo opravljenih na primerjanju avtomatske in ročne izolacije DNK (Lee in sod., 2010; Knepp in sod., 2003; Metwally in sod., 2008; Tang in sod., 2005). Iskali so metodo, ki bi dala visoko koncentracijo izolirane DNK, da bi bile tarče za pomnoževanje s polimerazo dobro izpostavljene in da lahko z njo optimalno odstranimo inhibitorje PCR in encime (Tang in sod., 2005). Ugotovili so, da avtomatska sicer skrajša čas obdelave vzorcev, vendar pa je pri njej večja možnost kontaminacije z aerosoli ali napake aparata tekom izolacije (Lee in sod., 2010; Knepp in sod., 2003). Izmed vseh avtomatskih izolacij se je za paciente s sepso najbolje izkazala metoda z MagNA Pure aparatom (Compact; Roche Diagnostic, IN), ki je povišala občutljivost molekularnih testov in skrajšala postopek obdelave (Reguerio in sod., 2010). Pri primerjavi avtomatske z ročno izolacijo nekateri menijo, da pri slednji pridobimo večjo količino DNK, ki je tudi bolj čista (Lee in sod., 2010). Skupina raziskovalcev s severne Irske je primerjala sedem različnih ročnih izolacijskih kompletov Qiagen komplet z litikazo (Qiagen, Hilden, Nemčija), Qiagen komplet s keramičnimi kroglicami (Qiagen, Hilden, Nemčija), MasterPure komplet za izolacijo gliv (Epicentre Biotechnologies, Illumina, Wisconsin), Benzil alkohol/gvanidin

hidroklorid komplet (Fredricks in Relman, 1998), Dr GenTle komplet (Takara Bio, Šiga, Japonska), izolacija glivne DNK z reagenti (Y-DER) (Pierce Biotechnology, Rockford, ZDA), in YeaStar komplet (Zymo research, Irvine, Kalifornija). Nekatere komplete izolacije so morali delno prilagoditi za izolacijo iz EDTA krvi, saj so bili štirje pripravljene za izolacijo DNK iz kulture gliv. Kvaliteto celotne nukleinske kisline so ocenili z UV absorbanco, komplete pa medsebojno primerjali z referenčnim Qiagen kit/lyticase, ki ga uporabljajo v laboratoriju. Primerjali so občutljivost, ceno, čas in potrebnost dodatnih aparatov za izvedbo. Kvaliteta in čistost izolata je bila pri vseh razen YeaStar kompletu nižja v primerjavi s Qiagen kit/lyticase kompletom. Hkrati je dosegel YeaStar komplet najvišjo občutljivost, je preprost, hiter, cenovno ugoden za izvedbo in ne zahteva posebnih dodatnih aparatov. Hkrati podatki kažejo, da je najbolj optimalen za izolacijo iz vzorcev krvi brez dodatkov (Metwally in sod., 2008).

Z našo raziskavo smo primerjali ročna izolacijska kita, Qiagen z litiakazo (Qiagen, Hilden, Nemčija) in YeaStar komplet (Zymo research, Irvine, Kalifornija), ter komplet za avtomatsko izolacijo, MagNA Pure (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Nemčija). Pri izolaciji DNK iz vodnega medija, se je za najboljšo izkazala izolacija s Qiagen kompletom. Pri *C. albicans* so bile CT vrednosti nizke pri visokih koncentracijah, pozitivne rezultate smo v 22,2 % dobili tudi pri koncentraciji 10 CFU/ml. Občutljivost je bila visoka tudi pri *C. glabrata*, saj smo zaznali v 44,4 % koncentracijo 1 CFU/ml. Boljši rezultati in nižje CT vrednosti pri sevu *C. glabrata* smo dobili verjetno zaradi boljšega naleganja sonde, saj smo izolacijski postopek pri obeh vrstah opravili enako.

Pri izolaciji iz krvi, ki je pomembnejša za rutinsko diagnostiko, smo v dvojniku izvedli za koncentracije od 10^4 do 10^1 CFU/ml. Za najboljšo izolacijsko metodo se je tu izkazala avtomatska metoda z MagNA Pure. Pri obeh vrstah smo s to metodo dobili najnižje CT vrednosti in visoko občutljivost (do 10 CFU/ml). Izolacijo smo z avtomatsko metodo izvedli tudi za koncentracije 5, 2.5 in 1 CFU/ml krvi. Pri *C. albicans* smo zaznali koncentracijo celic 1 CFU/ml (CT vrednost je bila dosežena v 40 ciklu). Izmed treh ponovitev vzorca je le en dal pozitiven rezultat, kar pomeni, da je potrebno PCR iz enega izolata opraviti v več ponovitvah. Pri vrsti *C. glabrata* smo dobili negativne rezultate, kar

bi lahko bila posledica ali osmoze celic zaradi priprave redčitve v vodnem mediju ali prisotnosti inhibitorjev v vzorcih.

Pri obeh ročnih izolacijah smo imeli težave predvsem pri spiranju DNK iz kolon, kar lahko pojasni slabše rezultate. Hkrati je pri ročni izolaciji večja možnost človeške napake ali prisotnost DNaz in drugih inhibitorjev v vzorcih. Sam PCR smo za vsak vzorec izvajali v trojniku, saj je mogoče, da v volumnu 5 μ l ne bi zajeli izolirane DNK.

Pri izolaciji DNK iz krvi smo uporabili tako več mesecev staro in kot tudi svežo EDTA kri, obe sta bili do izolacije shranjeni v hladilniku pri 4 °C. Rezultati PCR kažejo na to, da starost vzorcev krvi ni imela vpliva na izolacijo ali količino DNK, ki smo jo dodali v kri. Podobno so ugotovili tudi raziskovalci s Koreje, saj niso opazili sprememb pri količini in čistosti izolirane DNK iz krvnih strdkov (Lee in sod., 2010). Tekom izolacije smo pri izolacijskem postopku z MagNA Pure po inkubaciji na 65 °C imeli težave z vzorci, saj so ti postali sluzasti. Po dodatku reducenta DTT smo vzorec spravili v bolj tekoče stanje, da je aparat lažje opravil izolacijo. Iz rezultatov je razvidno, da tudi koagulacija krvi ni imela vpliva na avtomatsko izolacijo, čeprav smo dodali manjši volumen vzorca, kot bi to bilo potrebno, nam je avtomat vse izolacije izvedel brez težav.

Ko smo primerjali kateri del EDTA krvi je primernejši za izolacijo glivnih celic, se je izkazalo, da je za obe vrsti najprimernejša izolacija iz vzorca celotne krvi. Občutljivost je bila 100 % za vse koncentracije *C. albicans* (1000, 100 in 10 CFU/ml) in pri *C. glabrata* za 100 CFU/ml, medtem ko je bila pri 10 CFU/ml 66,7 %. Iz vzorcev usedline smo pri *C. albicans* dobili podobne CT vrednosti kot pri celotni krvi, vendar je bila občutljivost manjša (do 100 CFU/ml). Plazma ni dala pomembnih rezultatov, ker so se celice verjetno posedle na dno tekom centrifugiranja.

Nekatere študije opisujejo, da sta plazma in serum primernejša vzorca od celotne krvi. Raziskave so bile narejene na vzorcih hemokultur, vendar je potrebno poudariti, da so imeli vzorci, vključeni v raziskavo znatno višje izhodne koncentracije glivne DNK. Prvi so poskus izvedli s primerjavo celotne krvi in seruma, drugi pa so primerjali serum, plazmo in celotno kri (Bougnoux in sod., 1999; Lau in sod., 2010). Vollmer in sodelavci so opravili podobno študijo z inokulacijo v krvno redčitveno vrsto z EDTA in serumom. Vrednosti CT se med serumom in polno krvjo z EDTA niso bistveno razlikovale, pozitivne vrednosti CT

so bile dosežene v zaporednih ciklih. V naši raziskavi smo dobili CT vrednosti za kri z EDTA primerljive z njihovimi rezultati. Druge raziskave pa so pokazale, da ni razlik med serumom in celotno krvjo, predlagali pa so, da se za vse vzorce izvaja PCR v dveh ponovitvah. Če je en izmed vzorcev pozitiven, se smatra to kot pozitiven rezultat (Innings in sod., 2007). Podobno smo rezultate vrednotili tudi mi.

Če primerjamo sam potek dela vseh treh izolacij, smo ugotovili, da je avtomatska najhitrejša, za izvedbo potrebuje najmanj dela in ne zahteva rokovanja z nevarnimi kemikalijami. Izolacija z MagNA Pure je visoko občutljiva (1 CFU/ml) in ima tudi manjšo možnost človeške napake.

5.2 SKLEPI

- Občutljivost izolacije v vodnem mediju je za *C. albicans* znašala 10 CFU/ml za *C. glabrato* pa 1 CFU/ml
- Občutljivost izolacije krvi z EDTA je bila za *C. albicans* 1 CFU/ml krvi in 10 CFU/ml krvi za *C. glabrata*
- Za najbolj primerno metoda izolacije glivne DNK se je izkazala avtomatska izolacija z MagNa Pure Compact aparatom. Omogoča visoko občutljivost izolacije glivne DNK (do 1 CFU/ml krvi) poleg tega je možnost človeške napake in kontaminacije vzorca je pri tej metodi najmanjša.
- Vzorce z izolirano DNK moramo vsaj v dvojniku pomnožiti s PCR. V kolikor je eden izmed vzorcev pozitiven, se smatra rezultat kot pozitiven.
- Ugotovili smo, da niti koaguliranost niti starost krvi ne vplivata na kvaliteto ali občutljivost izolacije DNK z metodo MagNA Pure.
- Najbolj občutljiv vzorec EDTA krvi je celotna kri.

6 POVZETEK

Okužbe krvnega obtoka z mikroorganizmi so izredno nevarne in lahko privedejo do sepse ali celo smrti. Kadar okužbe povzročajo glive rodu *Candida* to imenujemo kandidoza. Najpogostejša povzročiteljica okužb je *C. albicans*, v zadnjih dveh desetletjih se je povečala incidenca okužb tudi z drugimi vrstami. Problem tovrstnih okužb je, da je povzročitelj lahko v krvnem obtoku občasno in v manjših koncentracijah in ga je težko dokazati. To predstavlja diagnostičen problem, ker do rezultatov pridemo pozno, pa je lahko usodno tudi za bolnika, ki ni pravočasno ustrezno zdravljen. V naši raziskavi smo primerjali tri izolacijske komplete za izolacijo glivne DNK iz vzorcev krvi in vode različnih koncentracij. V študijah kot referenčni komplet pogostokrat uporabljajo Qiagen komplet (Qiagen, Hilden, Nemčija). V primerjavi z avtomatsko izolacijo naj bi bila ročna boljše, saj je bolj občutljiva in specifična. Nasprotno pa naj bi avtomatska predstavljala krajši čas obdelave in manjšo možnost človeške napake. Mi smo primerjali ročni izolaciji Qiagen in YeaStar ter avtomatsko z MagNA Pure LC aparatom. Ugotovili smo, da je za izolacijo iz krvi najboljše metoda izolacije z MagNA Pure. Občutljivost je visoka, doseže koncentracijo celic 1 CFU/ml, hkrati je čas izolacije z njo najkrajši, najmanjša je možnost človeške napake in kontaminacije vzorca. Glivno DNK *C. albicans* smo zaznali pri koncentraciji celic 1 CFU/ml, pri koncentraciji 10 CFU/ml pa DNK vrste *C. glabrata*. Pri izolaciji z Qiagen kompletom smo sicer pri obeh sevih dobili pozitiven rezultat za koncentracije 10 CFU/ml, vendar so bile CT vrednosti višje (37 ciklov). Pomembno je, da vzorec z izolirano DNK pomnožimo vsaj v dvojniku, da povečamo občutljivost detekcije. Ugotovili smo, da je za izolacijo najboljša celotna kri z EDTA. Nasprotno se plazma in usedlina celic nista izkazali za primerna vzorca za izolacijo DNK, saj celice posedemo na dno in jih v plazmi ni, v usedlini celic pa jih lahko ne zajamemo za nadaljnjo obdelavo. Izkazalo se je tudi, da stara ali koagulirana kri ne vplivata na občutljivost izolacije z MagNA Pure izolacijo.

7 VIRI

Belanger S.D., Boissinot M., Menard C., Picard F.J., Bergeron M.G. 2002. Rapid detection of shiga toxin-producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular bacons on the smart cycler. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4: 1436-1440

Bougnoux M.E., Dupont C., Mateo C., Saulneir P., Faivre V., Payen D., Nicholas-Chanoine M.H. 1999. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 4: 925-930

Cepheid. 2011. SmartCycler system brochure. Sunnyvale, Cepheid: 12 str.

http://www.cepheid.com/media/files/brochures/SC_Brochure.pdf (7. 4. 2011)

Cole G.T. 2011. *Candida-Shmeeda: Beating the fungus: Basic biology of fungi*. San Antonio, University of Texas. Department of Biology: 3 str.

<http://overcomingcandida.com/mycology/mycology-3.htm> (23. 10. 2010)

Conde-Rosa A., Amador R., Perez-Torres D., Colon E., Sanchez-Rivera C., Niever-Plaza M., Gonzalez-Ramos M., Bertran-Pasarell J. 2010. Candidemia distribution, asociated risk factors and attributed mortality at a university-based medical center. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, 29,1: 26-29

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

Fidel P.L., Vazquez J.A., Sobel J.D. 1999. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 1: 80-96

Fredricks D.N., Relman D.A. 1998. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonat. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 10: 2810-2816

Hachem R., Hanna H., Kontoyiannis D., Jiang Y., Raad I. 2007. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer*, 112, 11: 2493-2499

Hazen H.C., Howell S.A. 2007. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. V: *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Murray P.R (ed.). Washington, D. C., ASM Press: 1762-1787

Inacio J., Flores O., Spencer-Martins I. 2008. Efficient identification of clinically relevant *Candida* yeast species by use of an assay combining panfungal loop-mediated isothermal DNA amplification with hybridization to species-specific oligonucleotide probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 2: 713-720

Innings A., Ullberg M., Johansson A., Rubin C.J., Noreus N., Isaksson M., Herrmann B. 2007. Multiplex real-time PCR targeting the RNase P RNA gene for detection and identification of *Candida* species in blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 3: 874-880

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

Klingspor L., Jalal S. 2006. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus spp.* from clinical samples using real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 8: 745-753

- Knepp J.H., Geahr M.A., Forman M.S., Valasamkis A. 2003. Comparison of automated and manual nucleic acid extraction methods for detection of enterovirus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 8: 3532-3236
- Lass-Flörl C. 2008. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*, 52: 197-205
- Lau A., Halliday C., Chen A., Playford E.G., Stanley K., Sorrell T.C. 2010. Comparison of whole blood, serum and plasma for early detection of candidemia by multiplex tandem PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 3: 811-816
- Lee J.H., Park Y., Choi J.R., Lee E.K., Kim H.S. 2010. Comparison of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei Medical Journal*, 51, 1: 104-110
- Maaroufi Y., Heymans C., De Bruyne J-M., Duchateau V., Rodriguez-Villalobos H., Aoun M., Crokaert F. 2003. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 7: 3293-3298
- Matos T. 2002a. Oportunistične glive. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 481-499
- Matos T. 2002b. Značilnost patogenih gliv. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 457-468
- Metwally L., Fairley D.J., Coyle P.V., Hay R.J., Hedderwick S., McCloskey B., O'Neill H.J., Webb C.H., Elbaz W., McMullan R. 2008. Improving molecular detection of *Candida* DNA in whole blood: comparison of seven fungal DNA extraction protocols using real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 57, 296-303

Pfaller M.A., Diekema D.J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 1: 133-163

Preuner S., Lion T. 2009. Towards molecular diagnostics of invasive fungal infections. *Expert Review Molecular Diagnostics*, 9, 5: 297-401

Quites-Malero I., Garcia-Rodriguez J., Gomez-Lopez A., Mingorance J. 2011. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *European Journal of Clinical Microbiologic Infectious Diseases*: doi: 10.1007/s10096-011-1277-z: 5 str.

Regueiro B.J., Varela-Ledo E., Martinez-Lemas L., Rodriguez-Calvino J., Aguilera A., Santos A., Gomez-Tato A., Alvarez-Escudero J. 2010. Automated extraction improves multiplex molecular detection of infection in septic patients. *PloS ONE*, 5, 10: e13387, doi: 10.1371/journal.pone.0013387: 8 str.

Richardson M.D. 2005. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, Suppl S1: I5-I11

Riemann K., Adamzik M., Frauenrath S., Egensperger R., Schmid K.W., Brockmeyer N.H., Siffert W. 2007. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 21: 244-248

Singh A., Goering R.V., Simjee S., Foley S.L., Zervos M.J. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 3: 512-530

Sullivan D.J., Henman M.C., Moran G.P., O'Neill L.C., Bennett D.E., Shanley D.B., Coleman D.C. 1996. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 44: 399-408

Tang Y-W., Sefers SE., Li H., Kohn D.J., Procop G.W. 2005. Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 9: 4830-4833

Tyagi S., Marras S.A.E., Kramer F.R. 2000. Wavelength-shifting molecular beacons. *Nature Biotechnology*, 18: 1191-1196

Vazquez J.A. 2003. *Epidemiology, management and prevention of invasive candidiasis*. New York, Medscape education: 6 str.

<http://cme.medscape.com/viewarticle/462510> (14. 10. 2010)

Vollmer T., Stormer M., Kleesiek K., Dreier J. 2008. Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 6: 1919-1926

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

White P.L., Archer A.E., Barnes R.A. 2005. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5: 2181-2187

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

Jarc A. Primerjava treh metod za izolacijo DNK kvasovk rodu *Candida*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologija, 2011

Zhao Y., Park S., Kreiswirth B.N., Ginocchio C.C., Veyret R., Laayoun A., Troesch A., Perlin D.S. 2009. Rapid real-time nucleic acid sequence-based amplification-molecular beacon platform to detect fungal and bacterial bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 7: 2067-2078

ZAHVALA

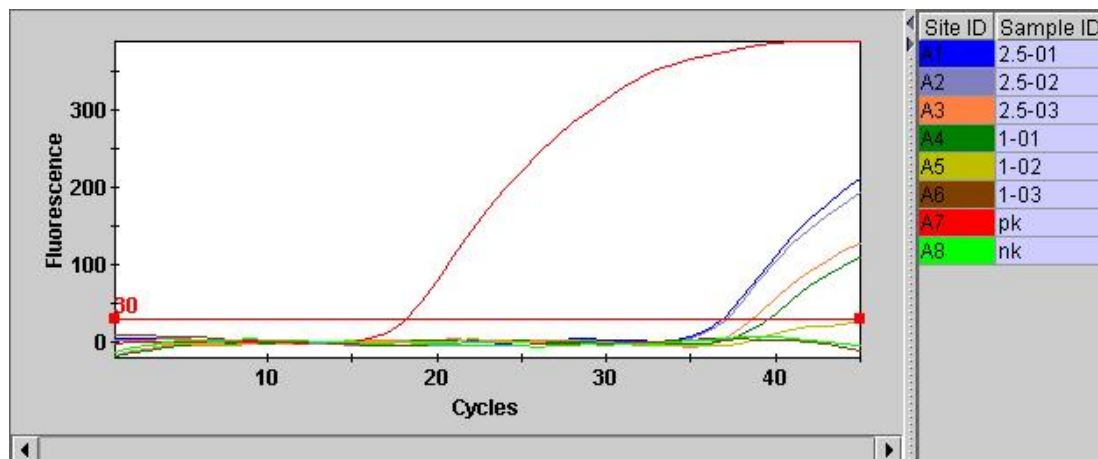
Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Tadeji Matos, dr. med. za sprejetje mentorstva ter za vso potrpežljivost, pomoč in svetovanje pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se Romini Kofol, univ. dipl. mikrob. za strokovno in nesebično pomoč pri izvajanju praktičnega dela izvedbe diplomske naloge.

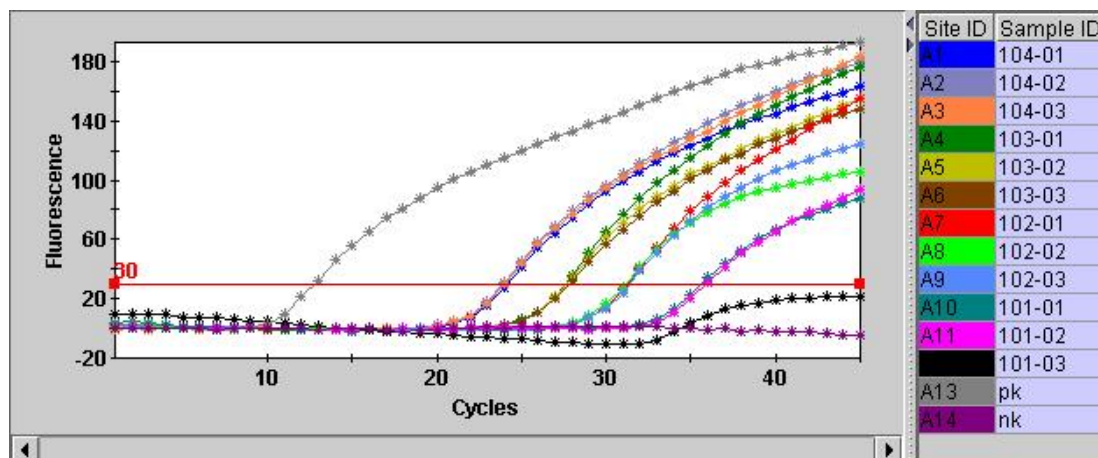
Zahvaljujem se tudi prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za recenzijo diplomske naloge.

Zahvaljujem se svoji družini in prijateljem za podporo.

PRILOGE



Priloga A: Prikaz pozitivnih rezultatov PCR in vrednosti CT v razmerju z naraščajočim številom ciklov za *Candida albicans*



Priloga B: Prikaz pozitivnih rezultatov PCR in vrednosti CT v razmerju z naraščajočim številom ciklov za *Candida glabrata*