



Imię i nazwisko autora rozprawy: Kasjan Szemiako

Dyscyplina naukowa: Biotechnologia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

**Konstrukcja nowych układów do diagnostyki molekularnej zakażeń
o etiologii *Candida* spp.**

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

**Design of new systems for molecular diagnosis of infections caused by
Candida spp.**

Promotor

podpis

dr hab. Beata Krawczyk prof. nadzw. PG

Gdańsk, 2016

Spis treści

1. Streszczenie	6
2. Wstęp	8
2.1. Zakażenia o etiologii <i>Candida</i> spp.....	8
2.1.1. Główne czynniki etiologiczne zakażeń	8
2.2. Formy kliniczne infekcji wywoływanych przez <i>Candida</i> spp.....	9
2.2.1. Formy kliniczne zakażeń powierzchniowych	10
2.2.2. Formy kliniczne inwazyjnych kandydoz.....	11
2.3. Leczenie	12
2.3.1. Problem oporności.....	14
2.4. Metody stosowane w diagnostyce drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i>	15
2.4.1. Metody klasycznej mikrobiologii.....	15
2.4.2. Laboratoryjna diagnostyka mikrobiologiczna zakażenia krwi grzybami z rodzaju <i>Candida</i>	16
2.4.3. Diagnostyka laboratoryjna grzybów z rodzaju <i>Candida</i> w oparciu o ocenę preparatu mikroskopowego, posiew na podłoża mikrobiologiczne i określenie morfologii wzrosłych kolonii.....	23
2.4.4. Wybrane testy komercyjne mające zastosowanie w identyfikacji grzybów z rodzaju <i>Candida</i> do poziomu gatunku w praktyce laboratoryjnej.....	26
2.5. Diagnostyka molekularna w wykrywaniu i identyfikacji drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i>	28
2.5.1. Diagnostyka kandydemii w oparciu o prostą reakcję PCR.....	30
2.5.2. Operon <i>rrn</i> jako cel molekularny do diagnostyki kandydemii.....	30
2.5.3. Wykorzystanie mitochondrialnego DNA do diagnostyki molekularnej <i>Candida</i>	33
2.5.4. Inne układy diagnostyczne oparte na standardowej reakcji PCR	33
2.5.5. <i>Real time</i> PCR	36
2.6. Projektowanie i optymalizacja reakcji PCR do diagnostyki.....	40
2.7. Problem inhibitorów w materiale diagnostycznego w reakcji PCR	43
2.8. Inne metody wykrywania <i>Candida</i> z pozytywnych próbek krwi.....	44
3. Cel pracy.....	46
4. Materiały i metody.....	47
4.1. Szczepy referencyjne <i>Candida</i> spp.....	47
4.2. Szczepy bakteryjne.....	47
4.3. Szczepy kliniczne <i>Candida</i> spp.....	47
4.4. Pożywki i podłoża hodowlane.....	50
4.5. Bufory.....	50

4.6. Polimerazy DNA.....	50
4.7. Master Mix <i>real-time</i> PCR	50
4.8. Startery oligonukleotydowe do reakcji PCR	51
4.9. Pozostałe roztwory i odczynniki.....	51
4.10. Enzymy restrykcyjne.....	52
4.11. Materiały podstawowe.....	52
4.12. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	52
4.13. Zestawy do izolacji DNA	53
4.14. Programy komputerowe	53
4.15. Hodowle drobnoustrojów	53
4.16. Izolacja genomowego DNA	54
4.17. Elektroforeza agarozowa	54
4.18. Elektroforeza poliakrylamidowa	54
4.19. Reakcja <i>touchdown</i> PCR do wykrywania pan- <i>Candida</i>	54
4.20. Reakcja <i>real-time</i> do wykrywania pan- <i>Candida</i>	55
4.21. Metoda t-RFLP do identyfikacji gatunkowej 6 klinicznie istotnych drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i> (<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i>)	56
4.22. Metoda złożonej reakcji PCR do identyfikacji 5 klinicznie istotnych gatunków z rodzaju <i>Candida</i> (<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i>)	57
4.23. Reakcja <i>real-time</i> do do identyfikacji 5 klinicznie istotnych gatunków z rodzaju <i>Candida</i> (<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i>)	57
5. Wyniki i dyskusja	58
5.1. Układy diagnostyczne oparte o gen syntazy homocytrynianowej.....	59
5.1.1. Analiza bioinformatyczna sekwencji genu syntazy homocytrynianowej.....	60
5.1.2. Specyficzna identyfikacja pan- <i>Candida</i>	61
5.1.2.1. Analiza bioinformatyczna sekwencji starterów do wykrywania <i>Candida</i> spp.....	61
5.1.2.2. Optymalizacja warunków reakcji PCR z wykorzystaniem pary starterów LYSF oraz LYSR1	67
5.1.2.3. Optymalizacja warunków reakcji PCR z wykorzystaniem pary starterów LYSF oraz LYSR2	70
5.1.2.4. <i>Touchdown</i> PCR	72
5.1.3. Specyficzna identyfikacja pan- <i>Candida</i> w reakcji <i>real-time</i> PCR.....	73
5.1.3.1. Analiza bioinformatyczna sekwencji starterów do wykrywania <i>Candida</i> spp. za pomocą reakcji <i>real-time</i> PCR.....	74
5.1.3.2. Weryfikacja układu opartego o gen <i>lys21</i> w klasycznej reakcji PCR.....	76

5.1.4. Metoda t-RFLP do identyfikacji gatunkowej sześciu klinicznie znaczących gatunków z rodzaju <i>Candida</i> (<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. krusei</i>).....	80
5.1.4.1. Analiza bioinformatyczna sekwencji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej w celu zastosowania do metody t-RFLP	82
5.1.5. Specyficzność i czułość układów diagnostycznych opartych o gen syntazy homocytrynianowej.....	88
5.1.6. Podsumowanie i dyskusja wyników dotyczących układów diagnostycznych opartych o gen syntazy homocytrynianowej.....	89
5.2. Układ multipleks PCR do identyfikacji pięciu klinicznie znaczących gatunków <i>Candida</i>	93
5.2.1. Wybór celów molekularnych do układu multipleks PCR.....	95
5.2.1.1.1. Analiza bioinformatyczna sekwencji genu akonitazy.....	95
5.2.1.1.2. Analiza bioinformatyczna sekwencji starterów do wykrywania <i>Candida albicans</i>	96
5.2.1.1.3. Optymalizacja warunków reakcji PCR do specyficznej identyfikacji <i>C. albicans</i>	99
5.2.1.1.4. Specyficzność opracowanego układu do identyfikacji <i>C. albicans</i>	101
5.2.1.2. Gen enolazy jako cel molekularny do wykrywania <i>C. krusei</i>	102
5.2.1.2.1. Analiza bioinformatyczna starterów do reakcji PCR w oparciu o gen enolazy	103
5.2.1.2.2. Optymalizacja warunków reakcji PCR do specyficznej identyfikacji <i>C. krusei</i>	106
5.2.1.2.3. Specyficzność układu do identyfikacji <i>C. krusei</i>	107
5.2.1.3. Gen <i>trf4</i> jako cel molekularny do identyfikacji <i>C. tropicalis</i> oraz <i>C. glabrata</i>	108
5.2.1.3.1. Analiza bioinformatyczna starterów do reakcji PCR	108
5.2.1.3.2. Optymalizacja warunków reakcji PCR do specyficznej identyfikacji <i>C. krusei</i>	112
5.2.1.3.2.1. Specyficzność układów do identyfikacji <i>C. tropicalis</i> oraz <i>C. glabrata</i>	114
5.2.1.4. Specyficzna identyfikacja <i>C. parapsilosis</i>	115
5.2.2. Opracowanie złożonej reakcji PCR (multipleks PCR)	116
5.2.2.1. Analiza bioinformatyczna starterów do reakcji multipleks PCR.....	116
5.2.2.2. Optymalizacja warunków reakcji dla układu multipleks PCR do identyfikacji pięciu klinicznie istotnych gatunków <i>Candida</i>	117
5.2.3. Podsumowanie i dyskusja wyników dotyczących układów diagnostycznych opartych o złożoną reakcję PCR.....	120
5.3. Układ diagnostyczny do identyfikacji pięciu gatunków z rodzaju <i>Candida</i> w oparciu o reakcję <i>real-time</i> PCR.	121

5.3.1. Analiza bioinformatyczna starterów do identyfikacji <i>C. albicans</i> i <i>C. parapsilosis</i> w reakcji <i>real-time</i> PCR.....	121
5.3.2. Optymalizacja warunków dla układu diagnostycznego do identyfikacji pięciu klinicznie istotnych drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i> z wykorzystaniem reakcji <i>real-time</i> PCR	126
5.3.3.1. Reakcja <i>real-time</i> PCR typu dupleks do wykrywania <i>C. tropicalis</i> i <i>C. parapsilosis</i>	131
5.3.3.2. Reakcja <i>real-time</i> PCR typu dupleks do wykrywania <i>C. albicans</i> i <i>C. krusei</i>	132
5.3.3.3. Reakcja <i>real-time</i> PCR typu tripleks do wykrywania <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> i <i>C. krusei</i>	134
5.3.4. Podsumowanie i dyskusja wyników dotyczących układów diagnostycznych opartych o metodę <i>real-time</i> PCR.....	135
5.4. Walidacja opracowanych układów diagnostycznych na szczepach izolowanych z próbek klinicznych.....	136
5.4.1. Identyfikacja szczepów w laboratorium klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku.....	136
5.5. Przeciwdziałanie inhibicji reakcji PCR w reakcjach diagnostycznych.....	146
5.6. Opracowanie procedury diagnostycznej do identyfikacji gatunkowej drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i> z pozytywnych hodowli krwi z aparatu BactAlert®.....	156
6. Podsumowanie.....	159
7. Literatura.....	162
8. Wykaz stosowanych skrótów.....	169
9. Spis tabel.....	170
10. Spis rycin.....	173

1. Streszczenie

Drożdżaki z rodzaju *Candida* są drobnoustrojami oportunistycznymi, zdolnymi do wywoływania zarówno infekcji powierzchniowych jak i układowych. Zakażenia krwi o etiologii *Candida* spp. stanowią coraz poważniejszy problem w szpitalach na całym świecie. Szybka diagnostyka jest kluczowym etapem procedury medycznej, gdyż umożliwia jak najszybsze podjęcie właściwego leczenia decydującego o przeżyciu pacjenta. Obecnie za ponad 90% infekcji odpowiedzialnych jest pięć gatunków *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*. Obserwuje się ciągły wzrost udziału zakażeń wywołanych przez drożdżaki należące do grupy gatunków non-*albicans Candida* (NAC). Obecnie rutynowymi metodami diagnostycznymi drożdżaków w laboratoriach klinicznych są metody hodowlane, a identyfikacja gatunkowa przeprowadzana jest w oparciu o wyniki testów biochemicznych. Podstawową wadą tych metod jest długi czas analizy wynoszący nawet 5 dni. W związku z tym, że różne gatunki *Candida* wykazują odmienną wrażliwość na niektóre leki (np. oporność *C. glabrata* i *C. krusei* na flukonazol), to rodzaj terapii zależny jest od gatunku wywołującego infekcję. Szczególnie w przypadku zakażeń krwi, szybka identyfikacja gatunkowa często decyduje o przeżyciu pacjenta. Dużo szybszym sposobem identyfikacji gatunkowej jest zastosowanie metod molekularnych opartych o amplifikację kwasów nukleinowych. Obecnie opisanych jest wiele układów i komercyjnych testów diagnostycznych w kierunku identyfikacji gatunkowej drożdżaków z rodzaju *Candida* wykorzystujących reakcję PCR. Dla większości tych metod celami molekularnymi są sekwencje DNA znajdujące się w obrębie operonu *rrn*. Niesie to ze sobą konieczność stosowania drogich rozwiązań do identyfikacji specyficznych amplikonów (sondy molekularne) oraz zwiększa ryzyko uzyskiwania wyników fałszywie pozytywnych. Wysokie koszty oznaczeń, droga aparatura (np. zamknięte, automatyczne systemy izolacji DNA), a także wykwalifikowany personel badawczy są podstawowymi ograniczeniami do stosowania obecnych na rynku testów molekularnych w laboratoriach klinicznych. W związku z powyższym wciąż poszukiwane są nowe metody diagnostyczne o wysokim potencjale aplikacyjnym w laboratoriach mikrobiologii klinicznej.

W niniejszej pracy przedstawiłem wyniki badań, których celem była konstrukcja nowych układów diagnostycznych do identyfikacji gatunkowej oraz rodzajowej drożdżaków *Candida* spp. z wykorzystaniem metod opartych o amplifikację specyficznych fragmentów DNA. W wyniku badań przeprowadzonych w trakcie realizacji pracy doktorskiej, wytypowałem nowe cele molekularne do diagnostyki zakażeń wywołanych przez drożdżaki z rodzaju *Candida* oraz opracowałem na ich podstawie metody

diagnostyczne, które w ostatnim etapie badań zostały wstępnie zwalidowane na szczepach klinicznych.

Na podstawie analizy piśmiennictwa wytypowałem cztery geny jako potencjalne cele molekularne do opracowania nowych metod diagnostycznych: gen syntazy homocytrynianowej (*lys21*), akonitazy (*aco*), enolazy (*eno*) oraz topoizomerazy (*trf4*). Wszystkie za wyjątkiem genu topoizomerazy po raz pierwszy wykorzystałem do identyfikacji gatunkowej drożdżaków z rodzaju *Candida*. Sekwencje specyficzne gatunkowo oraz rodzajowo wybrałem na podstawie analizy bioinformatycznej. Posłużyły one do zaprojektowania starterów oligonukleotydowych do reakcji PCR. W wyniku optymalizacji reakcji amplifikacji opracowałem szereg układów diagnostycznych do wykrywania i identyfikacji gatunkowej czynnika etiologicznego zakażeń wywoływanych przez drożdżaki z rodzaju *Candida*. Do identyfikacji rodzajowej pan-*Candida* opracowałem dwa układy wykorzystujące fragment genu syntazy homocytrynianowej: jeden oparty o standardową reakcję PCR, a drugi *real-time* PCR. Polimorfizm międzygatunkowy w obrębie amplifikowanej sekwencji umożliwił różnicowanie gatunkowe w reakcji *real-time* PCR na podstawie analizy profilu topnienia produktów amplifikacji. Zoptymalizowałem również układy do identyfikacji gatunkowej pięciu klinicznie istotnych gatunków *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*) z wykorzystaniem zarówno klasycznej reakcji PCR, jak również *real-time* PCR. W oparciu o wyniki uzyskane dla prostych reakcji PCR opracowałem układ wykorzystujący złożoną reakcję PCR (multiplex PCR) do wykrywania wszystkich badanych gatunków w jednej mieszaninie reakcyjnej. Wykazałem również możliwość konstrukcji układu złożonej reakcji *real-time* PCR. Wykrywanie wszystkich badanych gatunków *Candida* w jednej reakcji wymaga jednak zastosowania specyficznych gatunkowo sond molekularnych, ponieważ temperatury topnienia amplikonów pokrywają się pomiędzy gatunkami. Niemniej jednak opracowałem dwa układy do jednoczesnej identyfikacji dwóch gatunków (*C. tropicalis* i *C. parapsilosis* oraz *C. albicans* i *C. krusei*), a także układ do jednoczesnej identyfikacji trzech gatunków (*C. tropicalis*, *C. krusei* i *C. parapsilosis*) z wykorzystaniem barwników interkalujących i analizy profilu topnienia produktów amplifikacji.

W oparciu o analizę polimorfizmu genu syntazy homocytrynianowej opracowałem układ diagnostyczny wykorzystujący metodę analizy polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (*terminal Restriction Fragments Length Polymorphism* - tRFLP). W ten sposób po raz pierwszy wykazałem możliwość zastosowania tej metody do identyfikacji gatunkowej drobnoustrojów o znaczeniu klinicznym. Opracowana metoda

umożliwia identyfikację sześciu gatunków drożdżaków z rodzaju *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*).

Wszystkie układy diagnostyczne będące wynikiem realizacji badań optymalizowałem z wykorzystaniem referencyjnych szczepów *Candida*. Potwierdziłem również ich specyficzność uzyskując wyniki pozytywne dla odpowiednich gatunków *Candida* przy jednoczesnym braku amplifikacji na matrycy DNA bakteryjnego, ludzkiego oraz izolowanego z drożdży innego rodzaju. W celu wykazania potencjału aplikacyjnego opracowanych układów diagnostycznych w ostatnim etapie badań, przeprowadziłem ich wstępną walidację. Przeprowadziłem identyfikację gatunkową stu czterech klinicznych szczepów *Candida* pochodzących z Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. We wszystkich przypadkach otrzymałem wyniki zgodne z uzyskanymi w procedurze diagnostycznej Laboratorium.

W ostatnim etapie badań wykazałem, że zwiększenie stężenia polimerazy DNA w mieszaninie reakcyjnej przeciwdziała inhibicji reakcji PCR powodowanej przez związki obecne we krwi. Pozwoliło to na opracowanie procedury do identyfikacji gatunkowej drożdżaków z rodzaju *Candida* bezpośrednio z pozytywnych hodowli krwi. Podnosi to znacznie potencjał aplikacyjny opracowanych układów opartych o reakcję *real-time* i tworzy narzędzie do szybkiej identyfikacji gatunkowej kandydemii.

2. Wstęp

2.1. Zakażenia o etiologii *Candida* spp.

Infekcje wywoływane przez grzyby z rodzaju *Candida* są poważnym problemem klinicznym. Liczba zakażeń szpitalnych spowodowanych przez te drobnoustroje wzrosła dziesięciokrotnie w przeciągu ostatnich dwudziestu lat. Przyczyną jest m.in. nadużywanie antybiotyków, leczenie steroidami, cytostatykami oraz lekami immunosupresyjnymi, co ma miejsce w przypadku transplantacji, chorób nowotworowych oraz AIDS. Śmiertelność inwazyjnych kandydoz osiągnęła poziom 80%, co świadczy o istotności problemu tych zakażeń, które obecnie stanowią jedną z czterech najczęstszych przyczyn infekcji układu krwionośnego (Fricke i in. 2010).

2.1.1. Główne czynniki etiologiczne zakażeń

Znanych jest ponad dwieście różnych gatunków grzybów z rodzaju *Candida*, jednak zaledwie pięć z nich tj. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. krusei* odpowiedzialnych jest za wywoływanie ponad 90% wszystkich inwazyjnych kandydoz.

Dominującym patogenem w tego rodzaju zakażeniach w latach 80. ubiegłego wieku był gatunek *C. albicans* (ponad 80% przypadków). Obecnie obserwuje się spadek częstotliwości występowania zakażeń wywoływanych przez ten gatunek o około 50% (Lepak and Andes 2011). Natomiast coraz bardziej wzrasta znaczenie zakażeń o etiologii innej niż *C. albicans* (*non-albicans species*). Udział poszczególnych gatunków w odniesieniu do wszystkich przypadków infekcji wywołanych przez drożdżaki z rodzaju *Candida* jest różny w zależności od regionu świata. Gatunki nazywane ogólnie *non-albicans* najczęściej występują w Ameryce Południowej, Azji oraz południowej Europie. Występowanie poszczególnych gatunków z tej grupy, w odniesieniu do miejsc, gdzie stanowią one największy odsetek izolowanych od pacjentów grzybów z rodzaju *Candida*, przedstawiłem w tabeli nr 1 (Falagas 2010).

Obserwuje się również wzrost częstości występowania *C. glabrata* wraz z wiekiem pacjenta (Pfaller 2007).

Tabela 1 Miejsca najczęstszego występowania grzybów z rodzaju *Candida* nienależących do gatunku *C. albicans*¹.

Gatunek	Miejsce najczęstszego występowania
<i>C. glabrata</i>	USA, północna i środkowa Europa
<i>C. parapsilosis</i>	Ameryka Południowa, niektóre części Azji oraz południowa Europa
<i>C. tropicalis</i>	Ameryka Południowa oraz Azja
<i>C. krusei</i>	brak charakterystycznego regionu

2.2. Formy kliniczne infekcji wywoływanych przez *Candida* spp.

Oportunistyczne grzyby z rodzaju *Candida* występują jako naturalna mikroflora organizmu człowieka. Jednak w sytuacji obniżonej odporności organizmu gospodarza są one w stanie przekształcić się w groźne patogeny zagrażające zdrowiu i życiu pacjenta. W tabeli nr 2 przedstawiono miejsca oraz rodzaje potencjalnych infekcji wywoływanych przez poszczególne gatunki drożdżaków z rodzaju *Candida* (Lopez-Martinez 2010).

¹ źródło: opracowanie własne na podstawie (Falagas, Roussos and Vardakas 2010).

Tabela 2 Miejsce/rodzaj infekcji wywoływanych przez poszczególne gatunki grzybów z rodzaju *Candida*².

Gatunek	Jama ustna	Pochwa	Skóra	Paznokcie	Przewód pokarmowy	Systemowe	Fungemia
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	-	+	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	+	+	+	+	+
<i>C. kefyr</i>	+	+	-	-	-	-	+
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	+	+	+	+

W związku z tym, że każdy z gatunków drożdżaków ma szerokie spektrum występowania, nie można skorelować miejsca izolacji patogenu z prawdopodobnym gatunkiem powodującym infekcję, dlatego diagnostyka zakażeń wywoływanych przez te drobnoustroje staje się bardzo skomplikowana. Znaczna większość wszystkich rodzajów zakażeń może być wywołana przez niemal każdy gatunek drożdżaka z rodzaju *Candida*, dlatego konstruowane testy diagnostyczne muszą uwzględniać różnicowanie wszystkich klinicznie znaczących grzybów *Candida* sp.

2.2.1. Formy kliniczne zakażeń powierzchniowych

Kliniczne kandydozy powierzchniowe zostały sklasyfikowane w 4 grupy:

- **skórne** – najczęściej występującymi miejscami infekcji są różnego rodzaju zgięcia lub fałdy skóry, a głównymi czynnikami zwiększającymi ryzyko infekcji są: ciepło, wilgotność, maceracja naskórka i otyłość
- **błon śluzowych** – dzielą się na infekcje jamy ustnej oraz narządów płciowych. Występują niezależnie od wieku, jednak najgroźniejsze objawy obserwuje się w przypadku wcześniaków, karmiących matek oraz osób starszych.
- **paznokci** – dotyczą osób w każdym wieku, występują ze zwiększoną częstotliwością u chorych na cukrzycę. Czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia tego typu infekcji jest: ciągła wilgotność, maceracja, częsty manicure oraz choroby naczyniowe kończyn.
- **przewlekłe kandydozy skórno-śluzówkowe i ziarniakowe** – nie występują często, niemniej jednak mają bardzo ostry przebieg, dotyczą wszystkich tkanek

² źródło: (Lopez-Martinez 2010)

skóry. Najczęściej infekcje zlokalizowane są w okolicach twarzy, skóry głowy oraz rąk (Lopez-Martinez 2010).

2.2.2. Formy kliniczne inwazyjnych kandydoz

Kandydozy, które rozprzestrzeniają się za pomocą układu krwionośnego, mogą dotrzeć do praktycznie każdego organu. Pozytywny materiał diagnostyczny uznawany w normalnych warunkach za sterylny (za wyjątkiem moczu) wskazuje na infekcję, natomiast wynik pozytywny w przypadku takich materiałów jak: płwocina, nabłonek, błony śluzowe oraz płyn oskrzelowy lub z drenażu jamy brzusznej nie jest jednoznaczny. W związku z tym silna kolonizacja ciała przez drożdżaki z rodzaju *Candida*, jest znaczącym czynnikiem ryzyka w rozwoju poważnego zakażenia. Do opisywanych klinicznych, inwazyjnych form kandydoz należą:

- **kandydemie i rozległe kandydozy** – w grupie podwyższonego ryzyka znajdują się noworodki, pacjenci chirurgii jamy brzusznej, z poparzeniami, żywieni pozajelitowo, po przeszczepach oraz z różnego rodzaju nowotworami. Najczęstszym źródłem zakażenia jest kateter. W przypadku zdrowych pacjentów kandydemia może być przemijająca, jednak nawet bardzo krótka infekcja może spowodować przedostanie się drobnoustrojów do narządów wewnętrznych takich jak siatkówka oka, nerki czy kości. Rozprzestrzeniające się kandydemie mogą kończyć się bardzo szybką śmiercią pacjenta lub przybierać formy przewlekłe. Obecnie dostępne narzędzia diagnostyczne wciąż są niezadawalające w przypadku diagnostyki tego typu zakażeń.
- **kandydozy układu moczowego** – są jednymi z najtrudniejszych do zdiagnozowania. W przypadku kandydurii u kobiet pozytywny wynik badania często uznawany jest jako naturalna flora lub kontaminacja próbki. Zazwyczaj dochodzi również do asymptomatycznych przebiegów tego rodzaju zakażeń (np. kolonizacja pęcherza moczowego). Tego rodzaju infekcje mogą być bardzo niebezpieczne, gdyż niewdrożenie leczenia spowodowane brakiem objawów może doprowadzić do zakażenia nerek.
- **zapalenie otrzewnej wywołane przez *Candida spp.*** – występuje w dwóch przypadkach: u pacjentów chirurgicznych jamy brzusznej lub perforacji ściany jelita oraz u pacjentów z dializą otrzewnową. Tego rodzaju infekcje mogą mieć bardzo ciężki przebieg z objawami sepsy, jednak posiewy krwi są bardzo często negatywne.

- **zapalenie płuc wywołane przez *Candida spp.*** – kandydozy rozprzestrzeniające się poprzez układ krwionośny mogą doprowadzać do infekcji różnych narządów w tym również płuc. Częstotliwość występowania tego typu zakażeń nie została zbadana, jednak są przesłanki wskazujące na to, iż problem ten dotyczy głównie pacjentów leczonych immunosupresantami.
- **kandydozy przełyku i przewodu pokarmowego** – przełyk jest odcinkiem przewodu pokarmowego, który najczęściej ulega różnego rodzaju zakażeniom, jednak drożdżaki z rodzaju *Candida* są w stanie doprowadzić do infekcji praktycznie każdego elementu tego układu. Zakażenie to może mieć przebieg bezobjawowy lub powodować zamostkowy ból oraz problemy z przełykaniem. Najczęściej występuje w połączeniu z chemioterapią u pacjentów onkologicznych lub chorych na AIDS.
- **kandydozy oka** – z powodu krwiopochodnego zakażenia wnętrza gałki ocznej cierpi jedna trzecia pacjentów ze stwierdzoną kandydemią, dlatego jest jedną z najbardziej niepożądanych komplikacji ogólnoustrojowych kandydoz, która może doprowadzić do ślepoty. Zalecane jest, aby pacjenci z kandydemią przechodzili kompletne badania okulistyczne, żeby wykluczyć infekcję oczu.
- **inne** – występujące z mniejszą częstotliwością formy inwazyjnych kandydoz to:
 - zapalenie opon mózgowych
 - zapalenie szpiku
 - septyczne zapalenie stawów
 - zapalenie wsierdzia

Wszystkie z opisanych form inwazyjnych kandydoz rozprzestrzeniają się poprzez układ krwionośny i wymagają agresywnej, przedłużonej terapii. (Ostrosky-Zeichner i in. 2002)

2.3. Leczenie

Zakażenia wywoływane przez oportunistyczne grzyby z rodzaju *Candida* są bardzo niebezpieczne dla zdrowia i życia pacjentów. Dzieje się tak dlatego, że na rozwój infekcji narażeni są w szczególności pacjenci o obniżonej odporności lub w ciężkim stanie zdrowia. Do ocalenia zdrowia i życia pacjentów niezbędne jest, aby wdrożenie właściwego leczenia, jednak możliwe jest to tylko w przypadku szybkiej i bezbłędnej diagnozy. Wykazano, iż opóźnienie w podjęciu właściwego leczenia powyżej 24 i 48 godzin, jest ściśle związane ze śmiertelnością pacjentów z kandydemią (Pfaller 2007). W szpitalach

wciąż brakuje metod, które pozwalałyby sprostać tym wymaganiom. Lekarze dysponują jednak szeroką gamą różnego rodzaju farmaceutyków.

Związki te zostały odkryte w 1950 roku w postaci nystatyny oraz amfoterycyny B. Ich działanie przeciwgrzybicze polega na zwiększeniu przepuszczalności błony komórkowej tych drobnoustrojów poprzez oddziaływanie na ergosterol zawarty w błonie. Pomimo tego, że amfoterycyna B jest powszechnie używana w terapii antygrzybiczej (w przypadkach zakażeń ogólnoustrojowych) stosowanie jej jest ograniczone z powodu silnej toksyczności. Nystatyna nie znalazła zastosowania w leczeniu zakażeń systemowych z powodu znacznej nefrotoksyczności.

Amfoterycyna B ma bardzo szerokie spektrum działania, jednakże istnieją gatunki odporne na działanie tego leku. Należą do nich m. in.: *C. lusitaniae* oraz *C. tropicalis*.

Od 1944 roku azole znalazły zastosowanie w leczeniu inwazyjnych zakażeń grzybiczych. Grupa leków należących do tej rodziny dzieli się w zależności od tego, ile atomów azotu znajduje się w pierścieniu azolowym. Ze względu na to kryterium wyróżnia się następujące rodzaje:

- imidazole (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol)
- triazole (itrakonazol, flukonazol, worikonazol)

Działanie azoli polega na blokowaniu demetylazy lanosterolu, enzymu należącego do cytochromu P-450. Enzym ten jest niezbędny w biosyntezie ergosterolu, który jest podstawowym składnikiem błony komórkowej grzybów. Ten sam enzym występuje również u ludzi i jest odpowiedzialny za biosyntezę cholesterolu. Stosowanie tych związków jako antymikotyków jest możliwe dzięki znacznie większemu powinowactwu leku względem grzybiczego enzymu cytochromu P-450 niż ludzkiego.

Flukonazol jest jedynym azolem charakteryzującym się rozpuszczalnością w wodzie. Ma również szereg właściwości, które sprawiają, że jest bardzo dobrym lekiem.

Należą do nich:

- bardzo dobra wchłanianiałość w jamie ustnej
- wydalanie bezpośrednio przez nerki
- stosunkowo mało interakcji z innymi lekami
- wąskie spektrum działania skierowane przeciwko grzybom

Triazole są lekami pierwszej linii w przypadkach kandydoz błon śluzowych i krwi. Flucytozyna (analog pirymidyny) jest syntetycznym lekiem antygrzybiczym, który pierwotnie był zaprojektowany jako lek przeciwnowotworowy. Wnika on do komórek grzybów za pośrednictwem permeazy cytrynianowej. Związek ten podlega wewnątrzkomórkowej konwersji do 5-fluorouracylu i pełni rolę wadliwego nukleozydu, co blokuje biosyntezę białek na poziomie RNA. Absorpcja leku jest całkowita a jego wydalanie odbywa się poprzez nerki w postaci niemetabolizowanej.

Toksyczne działanie flucytozyny polega na:

- mielosupresji
- toksyczności wobec wątroby
- nietolerancji przez układ pokarmowy

Spektrum działania flucytozyny jest ograniczone do *Candida* spp. oraz *Cryptococcus neoformans*.

Echinokandyny są inhibitorami syntazy β -(1,3)-D-glukanu, enzymu obecnego w ścianie komórkowej grzybów, co uniemożliwia biosyntezę ściany komórkowej tym drobnoustrojom. Selektywna toksyczność tego leku zapewniona jest przez fakt, że enzym ten nie ma swojego odpowiednika u ludzi.

Pierwszą echinokandyną zatwierdzoną przez FDA (Food and Drug Administration) była kaspofungina. Jest ona wydalana przez wątrobę, a jej połowiczny czas rozpadu wynosi 9-12 godzin. Echinokandyny wykazują aktywność antymikotyczną wobec: *Aspergillus* spp. oraz *Candida* spp. w tym *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. glabrata* (Wu i in. 2004).

2.3.1. Problem oporności

Drożdżaki z rodzaju *Candida* wykazują naturalną oporność na niektóre ze stosowanych leków, podczas gdy inne są w pełni wrażliwe na dany antymikoty. Stwarza to poważne problemy w doborze odpowiedniej terapii. Często na wynik badania mikrobiologicznego czeka się od 48 do 72 godzin (w niektórych przypadkach nawet do pięciu dni). Jest to czas potrzebny na wykonanie posiewów i otrzymanie odpowiedniego wzrostu, umożliwiającego postawienie poprawnej diagnozy. Do tego czasu lekarz musi podejmować decyzje o leczeniu, nie znając konkretnego gatunku, który odpowiedzialny jest za wywołanie infekcji. Ciężki stan pacjenta powoduje, że każda niewłaściwa decyzja

może spowodować jego śmierć. Dlatego niezbędne jest opracowanie nowych technik diagnostycznych, umożliwiających szybkie otrzymanie wiarygodnych wyników. Znajomość drobnoustroju pozwoli lekarzowi na dobranie odpowiednich leków i wykluczy stosowanie niepotrzebnych i nieskutecznych farmaceutyków. W tabeli nr 3 przedstawiłem zestawienie najczęściej stosowanych leków w odniesieniu do ich aktywności antymikotycznej.

Tabela 3 Aktywność antymikotyczna najczęściej stosowanych leków wobec drożdżaków z rodzaju *Candida* („-,-brak aktywności, „+/-,-niska aktywność, „+”-średnia aktywność, „++”-dobra aktywność, „N”-brak danych)³.

	Polieny	Triazole			
	Amfoterycyna B oraz pochodne	Flukonazol	Itrakonazol	Worikonazol	Posakonazol
<i>C. albicans</i>	++	++	++	++	++
<i>C. glabrata</i>	++	+/-	N	+	+
<i>C. tropicalis</i>	++	++	++	++	++
<i>C. parapsilosis</i>	++	++	++	++	++
<i>C. krusei</i>	+	-	+/-	+	+

	Echinokandyny		
	Kaspofungina	Mikafungina	Anidulafungina
<i>C. albicans</i>	++	++	++
<i>C. glabrata</i>	++	++	++
<i>C. tropicalis</i>	++	++	++
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+
<i>C. krusei</i>	++	++	++

2.4. Metody stosowane w diagnostyce drożdżaków z rodzaju *Candida*

Metody umożliwiające diagnostykę zakażeń można podzielić na dwie grupy: klasyczne oraz molekularne. W szpitalach wciąż dominują metody klasycznej mikrobiologii, które obarczone są wieloma wadami.

2.4.1. Metody klasycznej mikrobiologii

Klasyczne metody identyfikacji zakażeń opierają się na wykonywaniu posiewów oraz hodowli mikroorganizmów na odpowiednie pożywki (podłoża). Diagnozy dokonuje się w oparciu o morfologię kolonii drobnoustrojów, jak również poprzez mikroskopowe obserwacje preparatów. W przypadku inwazyjnych kandydoz izolacja drobnoustrojów poprzez posiewy krwi jest złotym standardem. Jednakże w przypadku drożdżaków z rodzaju *Candida* tego typu metody są bardzo mało czułe i wymagają stosunkowo długiego czasu od pobrania materiału do wyniku diagnozy, która często nie jest

³ źródło: opracowanie własne na podstawie (Denning 2010)

jednoznaczna i wymaga doświadczonego personelu laboratoryjnego. Średni czas potrzebny na określenie gatunkowej przynależności czynnika etiologicznego wynosi blisko 86 godzin w przypadku *C. albicans* i może wydłużyć się do nawet 154 godzin dla *C. glabrata* (Lepak 2011).

Laboratoria kliniczne mogą skorzystać oprócz metod opartych na posiewach, również z różnego rodzaju testów biochemicznych np. testów API firmy bioMérieux (Pasligh i in. 2010) lub immunologicznych takich jak np. testy immunoenzymatyczne (ELISA). Ponadto, oprócz klasycznych podłoży mikrobiologicznych, opracowane zostały różnego rodzaju podłoża chromogenne, które nie wymagają analizy morfologicznej kolonii ani przygotowywania preparatów do mikroskopowania (Houang i in. 1997). Często jednak kliniczne szczepy drobnoustrojów stwarzają trudności w poprawnym odczytaniu wyniku i nawet doświadczony personel medyczny może mieć problem w poprawnym przyporządkowaniu otrzymanego wyniku do opisu producenta.

2.4.2. Laboratoryjna diagnostyka mikrobiologiczna zakażenia krwi grzybami z rodzaju *Candida*

Sepsa stanowi obecnie poważny problem w szpitalach na całym świecie. Dotyczy ona 18 mln ludzi rocznie (Slade i in. 2003). Przyczynia się do wielu poważnych skutków zdrowotnych oraz ekonomicznych. Do podstawowych skutków społecznych należy zaliczyć bardzo wysoką śmiertelność sięgającą ponad 50% pacjentów, u których zdiagnozowano sepsę. W Stanach Zjednoczonych średnio notuje się ponad 750 000 przypadków ciężkiej sepsy rocznie (Angus i in. 2001). Analiza 22-letniego okresu w amerykańskich szpitalach wykazała, że spośród 750 000 000 milionów hospitalizacji ponad 10 000 000 związanych było z sepsą. Ponadto, notuje się stałą tendencję wzrostową występowania tych przypadków. W roku 1979 odnotowywano 82,7 przypadków sepsy na 100 000 mieszkańców, podczas gdy w roku 2000 było to już 240,4 (Vincent i in., 2006). Obecnie wskaźnik ten w USA wynosi około 300 przypadków sepsy na 100 000 mieszkańców. W Europie stwierdza się dużo niższy odsetek występowania sepsy - średnio kształtuje się na poziomie 54-116 przypadków na 100 000 mieszkańców.

Grzyby z rodzaju *Candida* odpowiedzialne są za większość inwazyjnych infekcji grzybowych u ludzi. Ponadto liczba przypadków infekcji układu krwionośnego (kandydemii) znacząco wzrosła w przeciągu ostatnich lat (Martin 2003). Obecnie drożdżaki *Candida* są czwartym pod względem częstości występowania patogenem izolowanym z hodowli krwi w USA (Wisplinghoff 2004). Zgodnie z europejskimi statystykami mieszczą się w pierwszej dziesiątce czynników etiologicznych

odpowiedzialnych za infekcje krwi (Bouza 2008) (Bouza 1999). Obecnie szacuje się, że kandydemia dotyka 6,9 na 1000 pacjentów oddziałów intensywnej opieki medycznej (Kett 2011). Za przyczynę wzrostu częstości występowania przypadków kandydemii uznaje się wzrost liczby pacjentów, u których zdiagnozowano współistniejące choroby oraz występowanie czynników ryzyka do występowania inwazyjnych zakażeń powodowanych przez drożdżaki z rodzaju *Candida*. Najważniejszym czynnikiem decydującym o wyleczeniu pacjenta jest jak najszybsze wdrożenie odpowiedniego leczenia, co wiąże się z szybką identyfikacją gatunkową czynnika etiologicznego odpowiedzialnego za infekcję. Nawet 12-24-godzinne opóźnienie w takiej terapii może skutkować dwukrotnym wzrostem śmiertelności. Kiedy czas ten wynosi więcej niż 48 godzin parametr ten może osiągnąć wartość 78% (Blot i in. 2002).

Najważniejszym i podstawowym narzędziem dostępnym w diagnostyce do wykrywania fungemii (kandydemii) jest posiew krwi. Posiew krwi jest badaniem laboratoryjnym/mikrobiologicznym, gdzie próbka krwi o ściśle określonej objętości (tabela nr 4), pobrana od pacjenta z żyły jest wstrzykiwana do specjalnie w tym celu skonstruowanych butelek, zawierających płynne podłoża hodowlane (tabela nr 5). Z reguły nowoczesne i wielośrodkowe laboratoria mikrobiologiczne wyposażone są w automatyczne systemy diagnostyczne (m.in. BacT/ALERT i Bactec 9240), służące do inkubacji i detekcji drobnoustrojów w próbkach krwi (butelka z wstrzykniętą próbką krwi).

Tabela 4 Sugerowane do pobrania objętości krwi od niemowląt, dzieci i dorosłych.

Waga pacjenta w kilogramach (kg)	Zalecana objętość próbki krwi (w ml) pobranej na posiew mikrobiologiczny*/		Całkowita objętość próbki krwi (w ml) na posiew
	Hodowla nr I	Hodowla nr II	
< 1	2 /(BP)	-	2
1,1 – 2	2 /(BP)	2 /(BP)	4
2,1 – 12,7	4 /(BP)	2/ (BP)	6
12,8 – 36,3	10 /(BT)	10 /(BT)	20
> 36,3	20 /(BT i BN)	20 /(BT i BN)	40
> 50	20-30/ (BT i BN)	20-30 / (BT i BN)	40-60

Legenda: *Zalecana objętość ze względu na optymalizację odzysku mikroorganizmów w licznych przypadkach fungemii, w których występuje mniej niż 1 CFU na ml krwi; BP (PF)- butelka z podłożem pediatrycznym z dodatkiem neutralizatora antybiotyków; BT (SA, FA) – butelka z podłożem hodowlanym dostosowanym do wzrostu drobnoustrojów z grupy tlenowych; BB (SN, FN) – butelka z płynnym podłożem hodowlanym dostosowanym do wzrostu drobnoustrojów z grupy beztlenowych.

Tabela 5 Rodzaje podłoży hodowlanych w systemach BacT/ALERT®.

Grupa podłoż	Kod / typ butelki	Objętość (ml) podłoża i jego skład	Objętość próbki krwi lub płynów ustrojowych (ml)	Rekomendacje do posiewów w kierunku <i>Candida</i>
BacT/Alert SA	SA	Podłoże standardowe tlenowe - 40 ml wzbogaconego bulionu tryptozowo-sojowego	Do 10 ml	(+/-)
BacT/Alert SN	SN	Podłoże standardowe beztlenowe - 40 ml wzbogaconego bulionu tryptozowo-sojowego	Do 10 ml	(-)
BacT/Alert FA	FA	Podłoże tlenowe z neutralizatorem antybiotyków - 30 ml wzbogaconego peptonami bulionu tryptozowo-sojowego z dodatkiem wyciągu mózgowo-sercowego i węgla aktywnego	Do 10 ml	(++)
BacT/Alert FN	FN	Podłoże beztlenowe z neutralizatorem antybiotyków - 40 ml wzbogaconego peptonami bulionu tryptozowo-sojowego z dodatkiem wyciągu mózgowo-sercowego i węgla aktywnego	Do 10 ml	(-)
BacT/Alert PF plus	PF	Podłoże pediatryczne z neutralizatorem antybiotyków- 20 ml wzbogaconego peptonami bulionu tryptozowo-sojowego z dodatkiem wyciągu mózgowo-sercowego i węgla aktywnego	Do 4 ml (tylko krew, płyny ustrojowe - nie)	(+)

Legenda: (++) - bardzo dobry wzrost i odzysk; (+) - dobry wzrost i odzysk; (+/-) - słaby wzrost; (-) - brak wzrostu⁴.

Spośród dostępnych na rynku polskim urządzeń, najbardziej rozpowszechnionym/popularnym jest automatyczny system do posiewów krwi i płynów ustrojowych BacT/ALERT® 3D, który jest jednocześnie systemem monitorującym ww. posiewy w określonym, zaprogramowanym przez użytkownika, przedziale czasu tj. od 5 do 7 dni (standardowo) / >7 do 14 dla grzybów pleśniowych.

W tym systemie detekcja drobnoustrojów w próbkach krwi oparta jest na fotospektrometrycznym pomiarze zmiany zabarwienia (metoda kolorymetryczna) sensora butelki, który zbudowany jest z membrany zintegrowanej z dnem butelki (z jednej strony) i czujnikiem pH (z drugiej strony). Zmiana zabarwienia sensora zachodzi pod wpływem wzrostu stężenia CO₂ (dwutlenku węgla) w podłożach hodowlanych

⁴ źródło: (McDonald 2001)

i zmianie pH. Dwutlenek węgla, jak i inne metabolity (kwas octowy, propionowy czy butanowy), wydzielane są do ww. podłoża w trakcie podziału i namnażania się komórek grzybów oraz bakterii. Metabolity te dyfundując przez membranę są absorbowane przez czujnik, który przy złożonym poziomie metabolitów reaguje zmianą barwy z szarozielonej/szaro-niebieskiej na żółtą. Mierząc odbicie światła od sensora butelki, aparat BacT/ALERT 3D monitoruje i wykrywa zmiany koloru zachodzące w czujniku/sensorze, co zostaje przetworzone przez układ optyczny jako sygnał reflektancji. Rejestrowany sygnał reflektancji jest proporcjonalny do ilości monitorowanych metabolitów wytworzonych przez namnażające się drobnoustroje/grzyby (rycina 1).

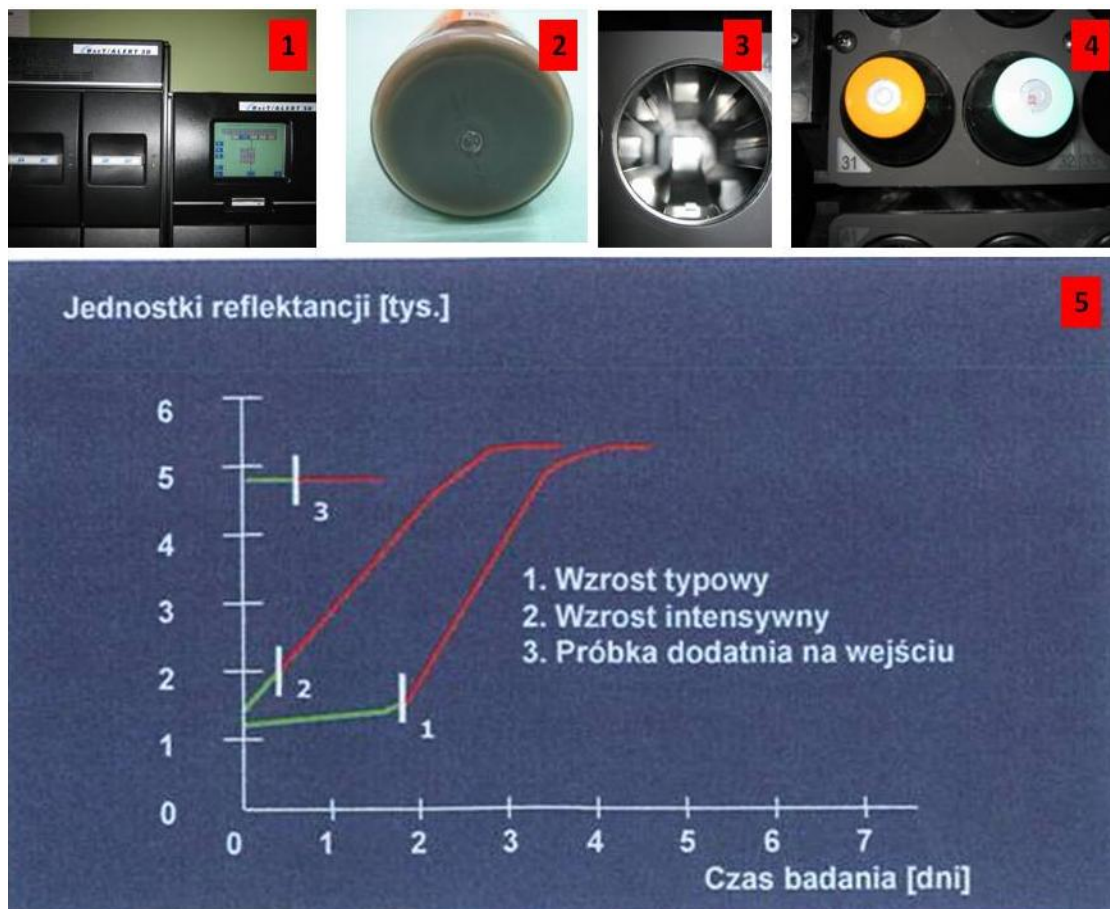


Rycina 1 Zasada detekcji grzybów z rodzaju *Candida* w próbkach krwi – system BacT/ALERT® 3D (rysunek własny).

Sygnały reflektancji są wzmacniane i przetwarzane cyfrowo przez komputer. Oprogramowanie komputerowe systemu BacT/ALERT® 3D zawiera algorytmy, których zadaniem jest codziesięciominutowa analiza danych w celu wyznaczenia krzywej zależności zmian reflektancji próby w czasie, o kształcie krzywej wzrostu i określenia wyniku dodatniego lub ujemnego dla badanej próbki krwi, w ściśle wyznaczonym przedziale czasu inkubacji (rycina 2).

W niniejszej pracy, do badań diagnostycznych, jako materiał badawczy wykorzystałem dodatkowo posiewy próbek krwi inkubowane i monitorowane w powyżej

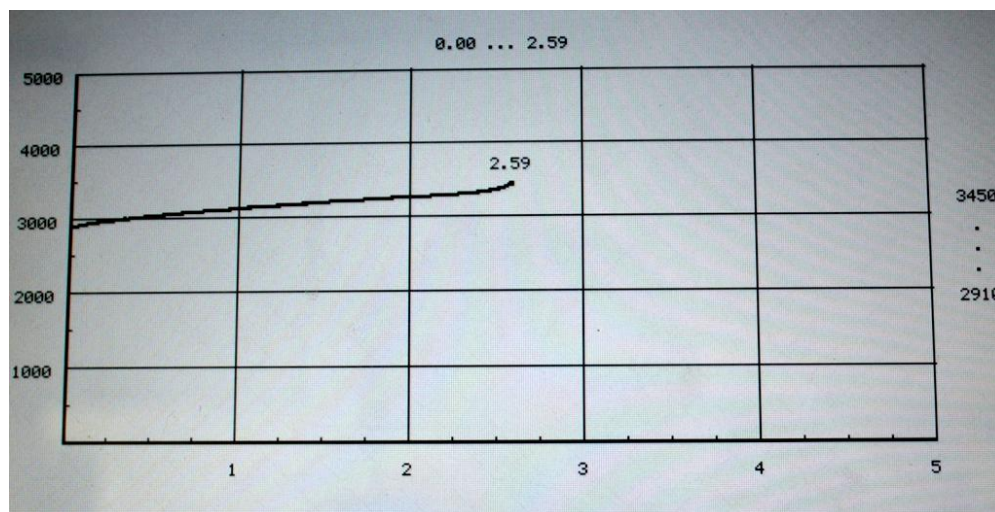
opisanym systemie, zatem w swoich rozważaniach pominąłem możliwości czy też zasady działania innych systemów diagnostycznych.



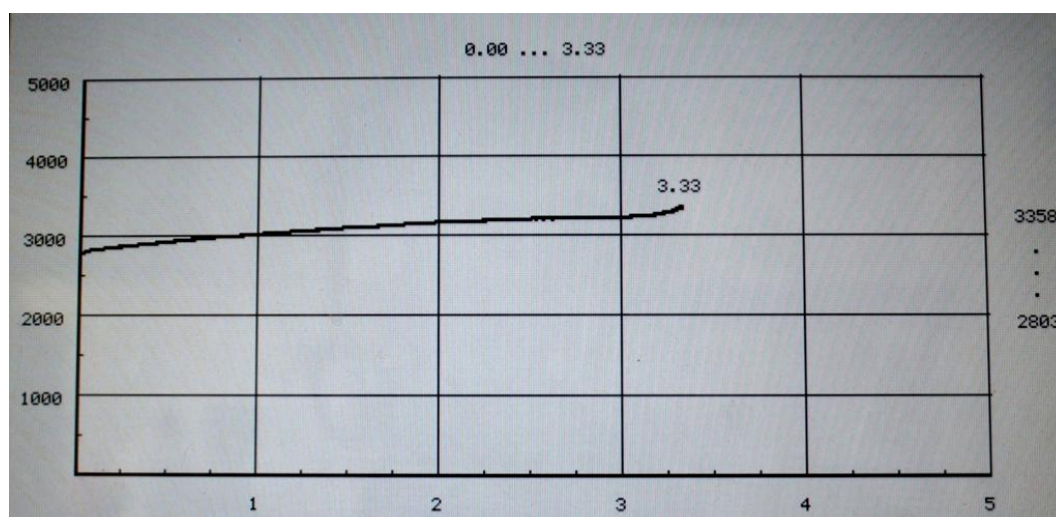
Rycina 2 Wykres krzywej zależności zmian reflektancji próby w czasie i trzy prawdopodobne algorytmy wzrostu mikroorganizmów w próbkach krwi – system BacT/ALERT® 3 D.

1- system BacT/ALERT 3D z modułami komór inkubacyjnych; 2- spód butelki z podłożem hodowlanym zaopatrzony w sensor; 3 – cela komory inkubacyjnej w systemie BacT/ALERT® 3D, do której wkłada się butelkę z wstrzykniętą próbką krwi; 4- butelki z podłożem umieszczone w celach bloków inkubacyjnych; 5 – trzy prawdopodobne algorytmy wzrostu mikroorganizmów w próbkach krwi.

Ryciny nr 3 i 4 przedstawiają przykładowe wykresy krzywej wzrostu wygenerowanej na podstawie analizy zależności zmian reflektancji inkubowanej, w systemie BacT/ALERT® 3D, próbki krwi od chorej z rozpoznaną klinicznie fungemią. Izolowanym czynnikiem etiologicznym była *Candida glabrata*. Dodatni wynik posiewu krwi otrzymano w ciągu: 62 h 9 min- hodowla 1 ;72 h 20 min- hodowla 2.

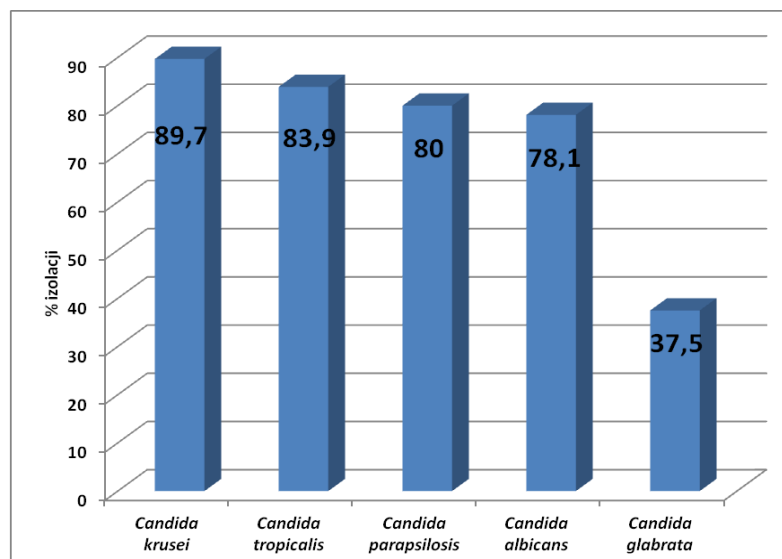


Rycina 3 . Krzywa zależności zmian reflektancji próby w czasie, o kształcie krzywej wzrostu dla dodatniego posiewu krwi (62 h 9 min), gdzie izolowanym czynnikiem etiologicznym była *Candida glabrata*; wzrost jednostek reflektancji z 2910 do 3450.



Rycina 4 Krzywa zależności zmian reflektancji próby w czasie, o kształcie krzywej wzrostu dla dodatniego posiewu krwi (72 h 20 min) gdzie izolowanym czynnikiem etiologicznym była *Candida glabrata*; wzrost jednostek reflektancji z 2803 do 3358.

Biorąc pod uwagę dane, jakie zebrałem w trakcie analizy literatury przedmiotu (rycina 5), jednoznacznie wskazujące na trudności diagnostyczne w detekcji grzybów z próbek krwi pobranych od chorych z podejrzeniem kandydemii, na potrzeby niniejszej pracy stworzyłem schemat diagnostyczny dotyczący pobierania krwi od ww. grupy chorych (tabela nr 6).



Rycina 5 Wykrywalność poszczególnych gatunków grzybów z rodzaju *Candida* z próbek krwi ⁵.

W schemacie tym uwzględniono wszystkie parametry, które mają decydujący wpływ na wykrywalność grzybów z rodzaju *Candida* z próbek krwi oraz zwiększają czułość ich odzysku z próbek krwi o 50-75% tj.:

- Rekomendowaną objętość próbki krwi - tabela 4,
- Czas pobrania kolejnych próbek krwi,
- Typ butelki z podłożem płynnym hodowlanym – tabela 5,
- Czas inkubacji butelki w systemie BacT/ALERT® 3 D.

⁵ źródło: (Meyer 2004)

Tabela 6 Schemat pobierania i posiewów próbek krwi pobranych od chorych hospitalizowanych z podejrzeniem kandydemii - zgodnie z procedurami obowiązującymi w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

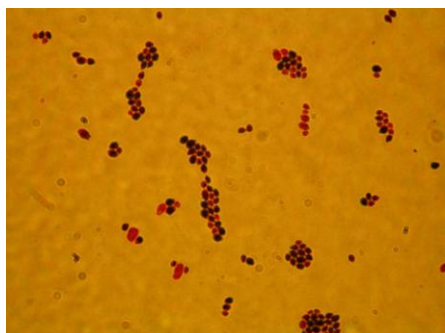
Parametr	Dzieci	Dorośli
Diagnostyka zakażeń krwi - obwód		
Typ podłoża/butelki	BacT/Alert PF plus	BacT/Alert FA
Rekomendowana objętość próbki krwi (waga/objętość)	<2kg – 2-4 ml 2-12kg – 6 ml 12-36kg – 20 ml	60 ml
Czas / miejsce	najlepiej pobrane w ciągu 0,5 godz. z różnych miejsc nakłucia	
Czas inkubacji w systemie BacT/ALERT 3D	minimum 5 dni	
Wskazania do dalszych posiewów krwi	Wskazane pobranie próbek krwi w kolejnych dobach	
Diagnostyka zakażeń wkłucia centralnego		
Schemat pobrania próbek krwi	Pobranie krwi z obwodu z wkłucia centralnego równocześnie i w tej samej objętości	

2.4.3. Diagnostyka laboratoryjna grzybów z rodzaju *Candida* w oparciu o ocenę preparatu mikroskopowego, posiew na podłoża mikrobiologiczne i określenie morfologii wzrosłych kolonii

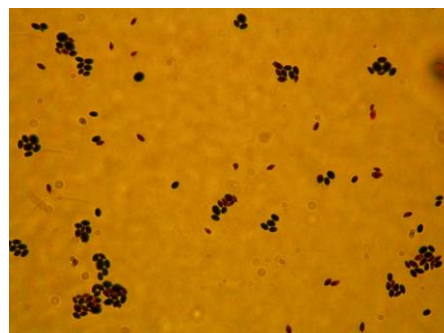
Dla materiałów klinicznych (tj.: płyny ustrojowe, aspiraty z dolnych dróg oddechowych, ropa/treść ropna, aspiraty z dróg rodnych i układu moczowo-płciowego, itd.), jak również dodatnich próbek krwi przed posiewem na stałe podłoża mikrobiologiczne (według ustalonej procedury) dokonuje się oceny mikroskopowej.

Mikroskopia obejmuje wykonanie z ww. grupy materiałów preparatu mikroskopowego barwionego metodą Grama. Ocenia się, w większości przypadków, nie tylko liczbę leukocytów wielojądrzastych, obojętnochłonnych czy też komórek nabłonka płaskiego, ale przede wszystkim komórki bakterii i grzybów tj.: ich kształt, zabarwienie ściany komórkowej oraz ich układ przestrzenny.

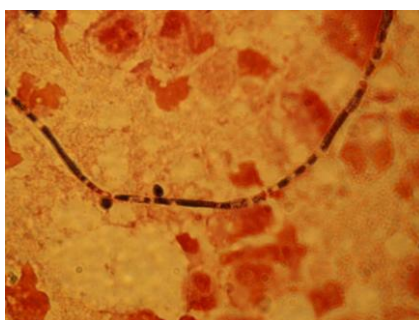
W przypadku komórek grzybów z rodzaju *Candida* w preparacie mikroskopowym barwionym metodą Grama nie zaobserwujemy specyficznych/charakterystycznych różnic, które byłyby podstawą do wstępnej identyfikacji gatunkowej. Jedynym wyjątkiem są blastospory *Candida krusei*, które w preparacie mikroskopowym mają kształt przypominający ziarna ryżu (ryciny nr 6-8).



Rycina 7 Komórki *Candida albicans* preparat mikroskopowy b. Grama x 1000 pow. [zdj. własne].



Rycina 6 Komórki *Candida krusei* preparat mikroskopowy b. Grama x 1000 pow. [zdj. własne].



Rycina 8 Forma inwazyjna *Candida albicans* (pseudomycelia) – materiał kliniczny: płyn z jamy brzusznej. Preparat barwiony metodą Grama; pow. x 1000, mikroskop Olympus [zdj. własne].

W stosunku do innych, najpowszechniej występujących w materiałach klinicznych gatunków grzybów z rodzaju *Candida*, nie obserwuje się takich różnic. Warto podkreślić fakt, że negatywny wynik preparatu mikroskopowego wykonanego z materiału klinicznego, nie wyklucza infekcji/kolonizacji grzybami z rodzaju *Candida*, ponieważ jego czułość jest ograniczona.

Kolejnym etapem w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej jest hodowla czyli posiew materiałów klinicznych na wybrane, stałe i/lub płynne podłoża mikrobiologiczne według ustalonych procedur obejmujących swoim zakresem: dobór podłoża, warunki atmosferyczne, czas inkubacji i temperaturę oraz technikę posiewu. Priorytetem w ustaleniu procedury jest znajomość spektrum patogenów w oparciu o rozpoznanie kliniczne czy też chorobę podstawową pacjenta, od którego pobrano materiał kliniczny celem wykonania badania mikrobiologicznego. W przypadku podejrzenia infekcji związanej z grzybami z rodzaju *Candida* w procedurze posiewu materiału uwzględnia się podłoża namnażające, namnażająco-selektywne (stałe oraz płynne) i chromogenne. Podłoża te są również standardowymi podłożami w przypadku re-izolacji kolonii grzybów, namnożenia i/lub uzyskania czystej hodowli wykorzystywanej w dalszych etapach diagnostyki laboratoryjnej, mającej na celu identyfikację do poziomu gatunku grzybów z rodzaju *Candida*.

Grzyby z rodzaju *Candida* nie są drobnoustrojami, które klasyfikuje się do grupy mikroorganizmów o szczególnych wymaganiach życiowych, co jednoznacznie wskazuje, że będą one wzrastać na wszystkich podłożach namnażających tj. agar Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej, podłoże czekoladowe czy też tryptozowo-sojowe w zakresie temperatur 24-37°C w atmosferze tlenowej. Ocena morfologii wzrosłych kolonii, uwzględniająca kształt samej kolonii jak i jej brzegu, wyniosłość nad podłoże i średnicę, barwę oraz połyskliwość, nie pozwala na identyfikację gatunkową.

Większość znanych gatunków grzybów z rodzaju *Candida* wzrasta na tych podłożach w postaci: białych, błyszczących, wypukłych kolonii o równych brzegach (rycina nr 9). Jedynym wyjątkiem, podobnie jak w przypadku zaobserwowanej różnicy dotyczącej oceny morfologii komórek, są kolonie *Candida krusei*. Wzrastają one w postaci matowych, płaskich kolonii o nieregularnych brzegach. Podłożem stałym, rutynowo stosowanym w diagnostyce mikrobiologicznej, jest podłoże Sabourauda z dodatkiem chloramfenikolu i gentamycyny, zaliczane do grupy podłoży selektywno-namnażających. Na tym podłożu wzrost i morfologia kolonii grzybów z rodzaju *Candida* nie będzie odbiegała w opisie charakterystycznych cech, jakie uwzględniłem powyżej (rycina nr 10)



Rycina 10 Kolonie *Candida* spp. wzrost na podłożu Sabourauda. Hodowla 48 godzinna w temp. 30°C [zdj. własne].



Rycina 9 Kolonie *Candida krusei* wzrost na podłożu Sabourauda. Hodowla 48 godzinna w temp. 30°C [zdj. własne].

Biorąc pod uwagę fakt, że z materiałów klinicznych pobranych od chorych najczęściej izoluje się cztery gatunki grzybów z rodzaju *Candida* tj.: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*, profesjonalne firmy zajmujące się diagnostyką mikrobiologiczną stworzyły podłoże stałe chromogenne, pozwalające na identyfikację ww. gatunków. Identyfikacja ta opiera się na ocenie morfologii kolonii, przy czym uwzględnia się zabarwienie wzrosłych kolonii i ich połyskliwość w świetle odbitym lub jej brak (tabela 7). Gatunki inne niż powyżej wymieniona grupa, wzrastają na tym podłożu jako kolonie o zabarwieniu białym, szaro-mlecznym, błyszczące lub matowe, o równych lub

postrzępionych brzegach i wymagają zastosowania innych testów/metod służących do identyfikacji gatunkowej rodzaju *Candida*.

Tabela 7 Identyfikacja gatunkowa grzybów z rodzaju *Candida* spp. na podłożu chromogennym Agar Candida ID (bioMérieux).

Gatunek	Barwa kolonii	Powierzchnia kolonii	Brzeg kolonii	Odczyt (godz.)
<i>C. albicans</i>	Turkusowa/miętowa	Gładka, błyszcząca	Gładki	24 / 72
<i>C. glabrata</i>	Jasnoróżowa	Gładka, błyszcząca	Gładki	24 / 72
<i>C. krusei</i>	Jasnoróżowa	Szorstka, matowa	nieregularny	24 / 72
<i>C. tropicalis</i>	Metaliczna niebieska granatowa	Gładka, błyszcząca	Gładki	24 / 72
<i>Candida</i> spp.	Mlecznobiała szaro mleczna kremowa	Gładka/szorstka/błyszcząca matowa	Gładki/nieregularny	24 / 72

Należy wyraźnie podkreślić, że poprawna identyfikacja gatunkowa w przypadku grzybów z rodzaju *Candida*, jest kluczowym elementem w doborze terapii lekami przeciwgrzybiczymi, zatem w stosunku do materiałów klinicznych o wysokiej wartości diagnostycznej tj. dodatnie próbki krwi, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn z worka osierdziowego, opłucnej, itd. identyfikacja do poziomu gatunku nie jest raportowana na podstawie oceny wzrostu kolonii na podłożu chromogennym. Należy ją bezwzględnie potwierdzić innymi dostępnymi metodami, opartymi o komercyjne testy wykorzystujące zdolność grzybów do fermentacji cukrów prostych czy też na podstawie cech biochemicznych odczytywanych za pomocą kolorymetrii. Testy te mogą być określane w literaturze przedmiotu jako automatyczne tj. karty z liofilizowanymi substratami biochemicznymi, inkubowane i odczytywane w automatycznych systemach przeznaczonych do badania identyfikacji gatunkowej i lekooporności (np. Vitek® 2 compact /bioMérieux) lub półautomatyczne opierające się na manualnym ich odczycie w oparciu o mniejszą liczbę cech biochemicznych możliwych do analizy w stosunku do testów automatycznych tj. paski API.

2.4.4. Wybrane testy komercyjne mające zastosowanie w identyfikacji grzybów z rodzaju *Candida* do poziomu gatunku w praktyce laboratoryjnej

Identyfikacja gatunkowa grzybów z rodzaju *Candida* izolowanych z materiałów klinicznych o wysokiej wartości diagnostycznej, pobranych od chorych w stanach zagrażających życiu i/lub z rozpoznaną klinicznie inwazyjną grzybicą, wymaga potwierdzenia poprawności identyfikacji gatunkowej. Spośród szerokiego wachlarza

testów dostępnych na rynku polskim omówię te najbardziej popularne i mające zastosowanie w praktyce laboratoryjnej.

Biorąc pod uwagę pracochłonność, ograniczenia oraz czułość i jakość dostępnych testów, można je podzielić na dwie grupy tj. testy półautomatyczne tzw. paski API oraz testy zintegrowane z systemami automatycznymi identyfikującymi drobnoustroje do poziomu gatunku oraz umożliwiające wykonanie badania wrażliwości na leki przeciwgrzybiczne tj.: Vitek®2 kompakt (bioMérieux) czy też systemu MicroScan® WalkAway SIEMENS.

Wprowadzenie do laboratorium systemów automatycznych, wiąże się z liczbą badań wykonywanych przez dane laboratorium mikrobiologiczne, co oczywiście ma przełożenie na cenę badania i wykorzystanie urządzeń. Zatem drugorzędowy ośrodek medyczny mający w swoich strukturach laboratorium mikrobiologiczne, będzie korzystał z wyników badań mikrobiologicznych, gdzie podstawową metodą identyfikacji drobnoustrojów są półautomatyczne testy biochemiczne. Tak więc laboratoria te będą głównym odbiorcą takich testów i wyniki badań bakteriologicznych dotyczące identyfikacji gatunkowej w głównej mierze będą oparte na nich.

Systemy automatyczne znalazły zastosowanie w laboratoriach mikrobiologicznych wykonujących badania, przede wszystkim dla ośrodków medycznych III referencji, które oprócz zwiększonej liczby badań, cechują się szerokim profilem wysokospecjalistycznych procedur medycznych. Wraz z inwazyjnymi zabiegami, wydłużoną hospitalizacją chorych oraz szerokospektralną antybiotykoterapią nieodłącznie odnotowuje się wzrost zakażeń związanych z grzybami z rodzaju *Candida*.

Spośród analizatorów spełniających funkcję systemów służących do identyfikacji i badania lekowrażliwości bakterii i grzybów w próbkach klinicznych najczęściej spotykanym jest Vitek® 2 kompakt (bioMérieux). System ten zaopatrzony jest w karty zawierające 64 studzienki z 47 fluorescencyjnymi testami biochemicznymi. W przypadku grzybów, karty ID YST (identyfikacja grzybów drożdżopodobnych) zapewniają możliwość identyfikacji 52 gatunków spośród rodzaju *Candida*, *Cryptococcus*, *Rodotoruia* oraz *Trichosporon*. Metoda odczytu wyników testów biochemicznych (w tym 20 testów określających zdolność asymilacji węgla) jest identyczna jak w przypadku omówionych powyżej szeregów biochemicznych - API przy czym wykonuje go nie użytkownik, ale system informatyczno-komputerowy w oparciu o zaawansowaną kolorymetrię (Graf i in. 2000). Poniżej przedstawiłem wady i zalety klasycznych testów diagnostycznych (tabela nr 8).

Tabela 8 Wady i zalety klasycznych testów diagnostycznych.

Wady	Zalety
<ul style="list-style-type: none"> • Długi okres oczekiwania na wynik (od 24 do 72 godzin) • Mała pula gatunków jakie można zidentyfikować • Problem z rozróżnianiem gatunków przy zakażeniach mieszanych • Możliwość zakażenia płytki identyfikacyjnej innym drobnoustrojem • Błędne odczyty pomiaru • Stosunkowo niski procent pozytywnych posiewów z krwi 	<ul style="list-style-type: none"> • Niski koszt • Badanie można przeprowadzić bez używania skomplikowanego i drogiego sprzętu

2.5. Diagnostyka molekularna w wykrywaniu i identyfikacji drożdżaków z rodzaju *Candida*

Wzrastająca ilość przypadków śmiertelnych kandydemii na oddziałach szpitalnych stała się podstawą do poszukiwania nowych metod diagnostycznych. Powodem zgonów pacjentów jest zbyt późne zdiagnozowanie czynnika etiologicznego, a co za tym idzie, opóźniona lub nieprawidłowo prowadzona terapia antymikotykiem. Wraz z rozwojem genomiki grzybów, zaczęto szukać molekularnych metod diagnostycznych, które byłyby bardziej specyficzne gatunkowo, a czas identyfikacji czynnika etiologicznego byłby znacznie krótszy. Metody molekularne mogą być oparte o wykrywanie kwasów nukleinowych lub białek. Techniki molekularne wykorzystywane do identyfikacji patogenów w krwi pełnej oraz uzyskanych w wyniku posiewu krwi, przedstawia rycina nr 13.

Metody te charakteryzują się wieloma zaletami w porównaniu do analiz klasycznych. Przykładowe cele molekularne i metody służące do identyfikacji *Candida* przedstawia tabela nr 9.

Tabela 9 Przykładowe metody molekularne do identyfikacji *Candida*.

Cel molekularny	Metoda	Wykrywane gatunki <i>Candida</i>	Odnosińnik literaturowy
ITS1/ITS2/5,8S rDNA	Multipleks PCR	Wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Fujita 2001
ITS1/ITS2	PCR połączony z elektroforezą kapilarną	Wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Chen 2001
18S rRNA	Pirosekwencjonowanie	Wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Gharizadeh 2004
ITS1/ITS2/5,8S rDNA	PCR-RFLP (<i>MspI</i>)	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>C. tropicalis</i>	Mousavi 2007
ITS 2	PCR EIA (Enzyme Immunoassay)	Wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Elie i in. 1998
Geny kodujące proteazy aspartyłowe	PCR	<i>C. albicans</i>	Flahaut 1998
Gen demetylazy lanosterolowej (L1A1)	Nested PCR	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>	Burgener- Kairuz i in. 1994
Gen aktyny (ACT1)	PCR	<i>Candida</i> spp.	Kan 1993
Gen <i>Hsp90</i> (kodujący białko szoku cieplnego)	PCR	<i>C. albicans</i>	Crampin 1993
Fragment genu kodującego cytochrom b	Sekwencjonowanie produktów PCR	Wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Yokoyama 2000
NADH5	Real-time PCR/ sondy TaqMan	<i>C. parapsilosis</i> <i>C. metapsilosis</i> <i>C. ortopsilosis</i>	Souza 2012
Sekwencje telomerowe mitochondrialnego DNA	PCR	<i>C. parapsilosis</i>	Nosek 2002
Gen topoiizomerazy II	Złożony PCR	Wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Kanbe 2002

ITS1/ITS2	Złożony PCR	<i>C. parapsilosis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. albicans</i>	Luo 2002
Gen Rnazy P	Złożony real-time PCR	Wszystkie klinicznie znaczące gatunki (identyfikacja gatunkowa (<i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> i <i>C. albicans</i>))	Innings 2007
18S rDNA/5,8S rDNA/ITS1	Mikromacierze DNA	Wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Sakai 2012
Geny kodujące rRNA	PNA FISH	Wszystkie klinicznie znaczące gatunki	Harris 2013

2.5.1. Diagnostyka kandydemii w oparciu o prostą reakcję PCR

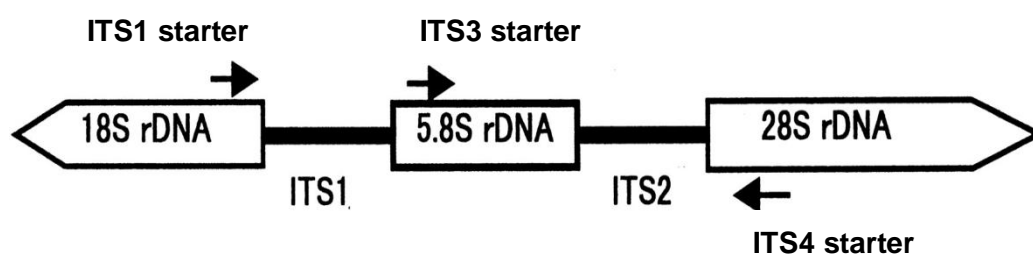
Podstawowym zadaniem podczas projektowania układu diagnostycznego opartego o reakcję PCR, jest wybór odpowiednich sekwencji, do których będą hybrydyzować startery oligonukleotydowe. Stosowane są dwie strategie. Jedna z nich polega na wyborze sekwencji specyficznych gatunkowo, co oznacza, że produkty reakcji PCR będą uzyskiwane jedynie w przypadku obecności DNA konkretnego gatunku *Candida* w badanej próbce. Wybrane cele molekularne muszą mieć zakonserwowane ewolucyjnie sekwencje, aby możliwe było otrzymanie pozytywnych wyników dla oddalonych od siebie szczepów przypisanych do tego samego gatunku. Z drugiej strony, sekwencje te nie mogą występować u innych gatunków *Candida*, w przeciwnym wypadku można uzyskać wyniki fałszywie pozytywne. Druga strategia polega na wykrywaniu sekwencji specyficznych dla całego rodzaju *Candida* bez przypisania do gatunku. Takie podejście służy wyłącznie do wykrywania infekcji drożdżakowych. Tego typu strategia ma dużo niższą wartość diagnostyczną, ponieważ nie dostarcza informacji, jaki należy obrać kierunek w leczeniu pacjenta. W przypadku identyfikacji zakażeń krwi, bardzo ważnym parametrem jest czułość metody. Niski próg wykrywalności patogenu wyrażony jako j.t.k./ml (liczba jednostek tworzących kolonię na mililitr krwi) pozwala uniknąć wyników fałszywie negatywnych, co jest jedną z przyczyn, które wskazują na przewagę metod molekularnych w diagnostyce mikrobiologicznej.

2.5.2. Operon *rrn* jako cel molekularny do diagnostyki kandydemii

W celu osiągnięcia wysokiej czułości metody, często jako cel molekularny stosuje się sekwencje (geny) występujące w więcej niż jednej kopii w genomie badanych

drobnoustrojów. Do jednych z najlepiej poznanych i najszerzej stosowanych należą geny zorganizowane w operon kodujący rybosomalne RNA. W haploidalnym genomie grzybów geny kodujące rRNA występują w 50-100 kopiach (Trtkova 2006). W skład operonu wchodzi gen kodujący małą podjednostkę rRNA (18S rDNA), gen kodujący 5,8S rDNA oraz gen kodujący dużą podjednostkę rRNA (25S rDNA), oddzielone regionami ITS1 i ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*).

Podczas gdy geny kodujące rRNA są silnie zakonserwowane ewolucyjnie, regiony ITS wykazują polimorfizm sekwencji. Geny wchodzące w skład operonu, mogą być dobrymi celami molekularnymi do identyfikacji grzybowego DNA, jednak nie umożliwiają identyfikacji rodzajowej czy gatunkowej. Do tego celu wykorzystuje się sekwencje niekodujące ITS, oddzielające geny poszczególnych podjednostek rRNA. Wykazują one obecność zarówno sekwencji zmiennych jak i zakonserwowanych ewolucyjnie, dając tym samym wiele możliwości do zaprojektowania odpowiednich starterów (Reiss i in. 1998).



Rycina 11 Schemat operonu *rrn* i miejsc hybrydyzacji starterów do identyfikacji gatunkowej grzybów.

Istnieje wiele strategii identyfikacji drobnoustrojów na podstawie różnic w sekwencji operonu *rrn*. Najprostsza z nich wymaga przeprowadzenia reakcji PCR z zastosowaniem specyficznych starterów oligonukleotydowych. Interpretacja wyniku ogranicza się jedynie do stwierdzenia obecności pożądanego amplikonu (wynik pozytywny świadczący o występowaniu danego gatunku *Candida* w próbce) bądź też jego braku (wynik negatywny). Problemem w takim podejściu staje się odpowiednie zaprojektowanie starterów do reakcji PCR gwarantujących wysoką specyficzną (Luo 2002). Innym podejściem jest różnicowanie gatunkowe na podstawie długości uzyskiwanych produktów reakcji PCR (Fujita 2001). Startery hybrydują w tym przypadku do zakonserwowanych sekwencji rybosomalnego DNA, a przypisanie do gatunku odbywa się na podstawie różnic w długości amplikonów. W związku z tym, że jest to jedyny parametr decydujący o identyfikacji gatunkowej, często niezbędne jest stosowanie droższych metod rozdzielania amplikonów jak np. elektroforezy kapilarnej (Chen 2001). Innym podejściem umożliwiającym wykrywanie wielu gatunków

jednocześnie, ale w wyniku przeprowadzenia jednej reakcji PCR, jest poddawanie amplikonów dalszym analizom. Oparte są one na sekwencjonowaniu otrzymanych produktów reakcji PCR. Uzyskane sekwencje porównywane są z odpowiednimi bazami danych i na tej podstawie przypisywane do odpowiedniego gatunku (Gharizadeh 2004) (Leaw 2006) (Trama 2005) (Lau 2007). Takie metody charakteryzują się bardzo dużą wiarygodnością uzyskiwanych wyników, ponieważ dotyczą dokładnych sekwencji oligonukleotydowych, a nie jedynie długości produktów amplifikacji. Tego rodzaju podejście może mieć zastosowanie w badaniu pokrewieństwa pomiędzy gatunkami o małym polimorfizmie genetycznym jak w przypadku *C. orthopsilosis* i *C. parapsilosis* (Yong 2008). Faktem jest, że najobszerniejsze bazy danych gromadzą sekwencje rDNA/RNA co sprawia, że najczęściej to one są wykorzystywane w diagnostyce molekularnej. Produkty otrzymane w reakcji PCR mogą zostać poddane trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Polimorfizm sekwencji amplikonów o zbliżonej długości (nierozróżnialnych w żelu agarozowym) umożliwia otrzymanie gatunkowo specyficznych wzorów restrykcyjnych (PCR – RFLP *Restriction Fragments Length Polymorphism*). Jest to wynikiem występowania różnej ilości miejsc cięcia dla enzymów restrykcyjnych oraz ich położeniem w obrębie amplikonu. Dotychczas powstało wiele prac opisujących zastosowanie tej metody w identyfikacji patogenów grzybowych, również z rodzaju *Candida*. W przypadku tych drożdżaków używany jest enzym *MspI* (Mousavi 2007) (Mirhendi 2006) (Mirhendi 2009), ale opracowano również układy wykorzystujące wiele innych endonukleaz restrykcyjnych (np. *AluI*, *BanI*, *BbsI*, *DraII*, *Eco147I* i *NheI*) (Neisters 1993) (Maiwald 1994). Technika PCR-RFLP można różnicować drobnoustroje na poziomie gatunków lub podgatunków.

Jednak trawienie enzymami restrykcyjnymi nie jest etapem weryfikującym specyficzność powstałych produktów amplifikacji, gdyż taką gwarancję daje jedynie obecność samego produktu powstałego w oparciu o specyficzne startery. Rozwiązaniem jest stosowanie sond specyficznych gatunkowo, które są wyznakowanymi (enzymatycznie lub fluorescencyjnie) oligonukleotydami komplementarnymi do wybranych sekwencji specyficznych gatunkowo. Zastosowanie techniki dot blot lub Southern-blot umożliwia jednoczesną weryfikację poprawności uzyskanych amplikonów oraz identyfikację gatunkową patogenów. Podstawową wadą tej metody są wysokie koszty (Elie i in. 1998). Drugim rozwiązaniem jest sekwencjonowanie powstałego produktu PCR i porównanie uzyskanej sekwencji z dostępnymi bazami (np. NCBI GenBank) zawierającymi sekwencje DNA dla różnych gatunków drobnoustrojów. Analiza polegająca na znalezieniu najbardziej podobnych lub wręcz identycznych sekwencji pozwala na zdeterminowanie gatunku, dla



którego otrzymano produkt PCR. Można zastosować też tzw. zagnieżdżony PCR (nested PCR), który poprawia nie tylko czułość reakcji, ale i gwarantuje jej specyficzność.

Wysoka czułość diagnostyczna oraz stały charakter sekwencji wykorzystywanych w metodach opartych o amplifikację rybosomalnego DNA sprawia, że są one bardzo wrażliwe na kontaminację. Wśród innych genów występujących w wielu kopiach w komórce rozważanych jako dobre cele molekularne do diagnostyki zakażeń grzybiczych, należą geny kodujące proteiny aspartylowe (Flahaut 1998). W projektowaniu układów specyficznych rodzajowo lub gatunkowo dla *Candida* stosuje się bardzo często geny występujące w pojedynczych kopiach. Do opisanych dotychczas w literaturze genów wykorzystywanych w diagnostyce molekularnej zakażeń *Candida* spp. należą: gen demetylazy lanosterolowej P450 14 α (L1A1) (*C. albicans* i *C. glabrata*) (Burgener-Kairuz i in. 1994), gen aktyny (*ACT1*) (*Candida* spp.) (Kan 1993) oraz gen kodujący białko szoku cieplnego 90 (*Hsp90*) (*heat shock protein*) (*C. albicans*) (Crampin 1993).

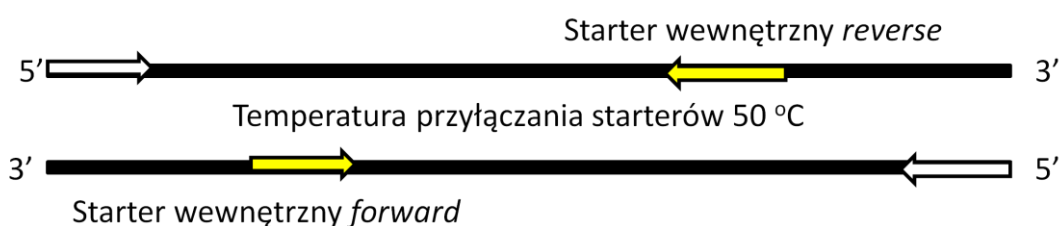
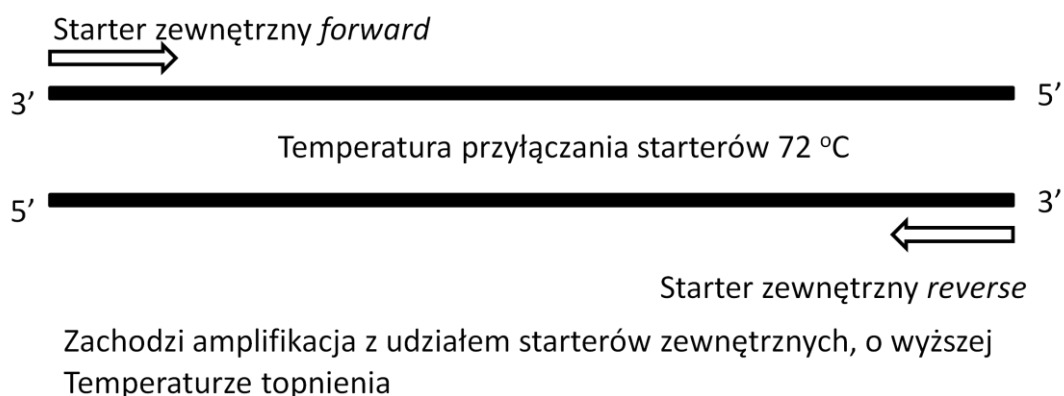
2.5.3. Wykorzystanie mitochondrialnego DNA do diagnostyki molekularnej *Candida*

W mitochondrium znajduje się oddzielny materiał genetyczny zgromadzony w postaci mitochondrialnego DNA (mtDNA). To charakterystyczne DNA odpowiedzialne jest za kodowanie cząsteczek tRNA podjednostek 12S i 16S mitochondrialnych rybosomów, jak również enzymów biorących udział w cyklu oddechowym. Dotychczas opracowano układy do diagnostyki zakażeń wywoływanych przez *Candida* spp. oparte o sekwencje kodujące cytochrom b (Yokoyama 2000), oraz dehydrogenazy NADH (Souza 2012). Liniowa struktura mtDNA występująca u niektórych gatunków *Candida*, pozwala na wykorzystanie sekwencji telomerowych do identyfikacji gatunkowej drożdżaków (Nosek i in. 2002). Niska zawartość reszt GC w mitochondrialnym DNA umożliwia selektywne trawienie enzymami restrykcyjnymi genomowego DNA, które jest bogatsze w pary GC. Wykorzystanie endonukleaz rozpoznających sekwencje bogate w GC, skutkuje uzyskaniem fragmentów mtDNA o znaczeniu diagnostycznym, gdyż w wyniku trawienia genomowe DNA zostanie strawione do kilkunastonukleotydowych fragmentów, co pozwala na analizę tylko mitochondrialnego DNA (Pramateftaki 2000).

2.5.4. Inne układy diagnostyczne oparte na standardowej reakcji PCR

W celu podniesienia specyficzności i czułości reakcji PCR, powstała metoda wewnętrznego (zwanego też zagnieżdżonym) PCR, bądź z języka angielskiego *nested* PCR. Składa się ona z dwóch prostych reakcji PCR opartych na tym samym celu molekularnym.

Używane są dwie pary starterów: zewnętrzne i wewnętrzne. Pierwsza para starterów daje produkty PCR dłuższe, które stają się matrycą do przeprowadzenia kolejnej reakcji wykorzystującej drugi zestaw starterów. W przypadku braku oddziaływań pomiędzy starterami, można obie reakcje przeprowadzić w jednej probówce, jedną po drugiej. Zastosowanie *nested* PCR zapewnia wyższą czułość metody diagnostycznej, ponieważ w wyniku pierwszej reakcji PCR powstaje jeszcze niewielka ilość matrycy, której część sekwencji jest następnie powielana w reakcji wewnętrznej. Ogólnie mówiąc pierwsza (zewnętrzna) reakcja selekcionuje DNA dostępne w większej ilości do przeprowadzenia reakcji wewnętrznej. Re-amplifikacja ze starterami wewnętrznymi może służyć również do weryfikacji specyficzności pierwszego produktu amplifikacji, a jednocześnie podnosi czułość reakcji. Cztery startery muszą specyficznie hybrydyzować do wybranych sekwencji, aby uzyskać ostateczny produkt w odróżnieniu do klasycznej reakcji PCR, gdzie pracują tylko dwa startery. *Nested* PCR również zapewnia redukcję kontaminacji produktów wynikających z niespecyficznego wiązania starterów do matrycy. Należy pamiętać, że prowadzenie reakcji *nested* PCR w dwóch oddzielnych probówkach, zwiększa jednak ryzyko kontaminacji. Rozwiązaniem tego problemu jest prowadzenie reakcji typu *nested* PCR w jednej mieszaninie reakcyjnej. Możliwe jest to dzięki zastosowaniu dwóch par starterów jednocześnie, z czego startery do reakcji zewnętrznej charakteryzują się wyższą temperaturą topnienia. W pierwszych cyklach amplifikacji uzyskiwane są amplikony, które wraz z obniżaniem temperatury hybrydyzacji w kolejnych cyklach reakcji, stają się matrycą dla starterów wewnętrznych, które dopiero po obniżeniu temperatury przyłączania mogą hybrydyzować do matrycy DNA. W reakcji PCR powstają też produkty pośrednie, na bazie starterów zewnętrznych i wewnętrznych, które jednak nie są wykrywane.



Po obniżeniu temperatury przyłączania starterów możliwa jest amplifikacja z udziałem starterów wewnętrznych



Zachodzi właściwa amplifikacja mniejszego fragmentu będącego w obrębie sekwencji flankujących, do których hybrydują startery zewnętrzne

Rycina 12 Schemat reakcji *nested* PCR przeprowadzanej w jednej mieszaninie reakcyjnej.

Identyfikacja DNA *Candida* spp. w oparciu o *nested* PCR wykorzystuje sekwencje kodujące rybosomalne RNA. Produkt pierwszej reakcji PCR obejmuje sekwencje ITS1 oraz ITS2, a ich amplifikacja odbywa się z zastosowaniem starterów umożliwiających otrzymywanie produktów dla wszystkich grzybów. Dopiero reakcja wewnętrzna oparta jest na starterach specyficznych dla poszczególnych gatunków drożdżaków z rodzaju *Candida*. Wymaga to jednak przeprowadzenia szeregu reakcji, gdyż w każdej z nich wykrywany jest tylko jeden gatunek (Burgener-Kairuz 1994).

Rozwiązaniem, które umożliwia amplifikację wielu celów molekularnych znajdujących się w obrębie różnych *loci* lub matryc, jest reakcja złożonego PCR (*multiplex* PCR). Polega ona na zastosowaniu więcej niż jednej pary starterów w jednej mieszaninie reakcyjnej, a każda z nich wykazuje specyficzność do sekwencji charakterystycznych dla poszczególnych gatunków. Dzięki temu uproszczona zostaje procedura identyfikacji, gdyż

nie ma konieczności przeprowadzania wielu reakcji oraz zużywa się mniejszą ilość stosunkowo drogich odczynników. Układy umożliwiające identyfikację wielu gatunków *Candida* w reakcji złożonego PCR wykorzystują geny kodujące topoizomerazę II (Kanbe 20020 oraz rRNA (Luo 2002).

2.5.5. *Real time* PCR

W związku z ciągłym zapotrzebowaniem na coraz szybsze oraz bardziej czułe i specyficzne metody identyfikacji patogenów, nastąpił kolejny milowy krok w rozwoju molekularnych metod diagnostycznych opartych o amplifikację fragmentów DNA, którym było stworzenie reakcji amplifikacji w czasie rzeczywistym (*real-time* PCR). Podstawowy mechanizm reakcji jest tożsamy z łańcuchową reakcją polimerazy. Podstawową różnicą jest sposób detekcji powstających amplikonów. Nowością w tej metodzie jest to, że ilość kopii badanej cząsteczki kwasu nukleinowego jest monitorowana w każdym cyklu reakcji amplifikacji z zastosowaniem różnych technik fluorescencyjnych, a nie jak to miało miejsce w przypadku tradycyjnej reakcji PCR, tj. dopiero po jej zakończeniu i elektroforezie.

W *real-time* PCR stosuje się różne cząsteczki reporterowe, które mają zdolność do fluorescencji. Emisja fluorescencji odzwierciedla akumulację produktów PCR w każdym cyklu amplifikacyjnym – mierzy się kinetykę reakcji we wczesnej fazie reakcji PCR. Detekcja w metodzie *real-time* PCR jest możliwa dzięki zastosowaniu specyficznych sond lub barwników fluorescencyjnych, które wiążą się niespecyficznie do dwuniciowego DNA.

Sondy wykorzystywane w *real-time* PCR składają się ze specyficznej sekwencji oligonukleotydowej komplementarnej do fragmentu amplikonu. Do niej dołączone są różnego rodzaju znaczniki fluorescencyjne. Istnieje wiele mechanizmów wzbudzenia fluorescencji sondy, natomiast zawsze jest to związane z jej hybrydyzacją do powstających produktów. Emitowane światło o odpowiedniej długości fali jest odbierane przez odpowiadający mu kanał detektora. Im większą ilością kanałów dysponuje termocykler, tym więcej rodzajów produktów można otrzymywać w jednej reakcji PCR (stosując wiele starterów w jednej mieszaninie używa się tzw. układ *multiplex real-time* PCR). Taki sposób detekcji charakteryzuje się wysoką specyficznością i czułością, ponieważ sygnał będzie uzyskiwany jedynie w przypadku obecności sekwencji komplementarnych do używanej sondy. Podstawową wadą tego rodzaju detekcji są wysokie koszty odczynników i aparatury pozwalającej na detekcję fluorescencji pochodzącej z wielu różnych sond (Selvarangan 2002) (Innings 2007) (Hendolin i in. 2002) (Klingspor 2006). Podstawowymi rodzajami sond używanymi w reakcji *real time* są: sondy podwójnie

znakowane, typu *molecular beacon* oraz typu *scorpion*. Sondy podwójnie znakowane są jednoniciowym oligonukleotydem o specyficznej sekwencji wyznakowanym za pomocą barwnika na jednym końcu oraz wygaszacza fluorescencji na drugim. Hydroliza wiązania wygaszacza podczas syntezy (elongacji) powoduje wzrost fluorescencji pochodzącej od cząsteczki barwnika reporterowego. Mierzony sygnał jest zatem wprost proporcjonalny do ilości powstałych w wyniku amplifikacji kopii DNA. Zasada działania sond typu *molecular beacon* również opiera się na wygaszaniu fluorescencji przez odpowiednie związki dołączone do sondy po przeciwnej stronie niż barwnik. Przybiera ona jednak strukturę "szpilki do włosów", co powoduje zbliżenie wygaszacza i barwnika, i tym samym skutkuje brakiem fluorescencji. Hybrydyzacja sondy do amplikonu powoduje rozerwanie struktury szpilki, oddalenie od siebie wygaszacza i barwnika, co skutkuje emisją światła. Sondy typu *scorpion* wykorzystują ten sam mechanizm. Różnica polega na tym, iż do sondy dołączony jest starter reakcji PCR, który wraz z sondą hybrydyzuje do odpowiedniej sekwencji matrycowego DNA. Podczas reakcji syntetyzowana jest sekwencja pozwalająca na otworzenie się struktury szpilki poprzez hybrydyzację do nowo powstałego odcinka DNA. Znalezienie się cząsteczki barwnika w większej odległości od wygaszacza, skutkuje zwiększeniem jej poziomu fluorescencji, co zostaje zarejestrowane przez detektor.

Alternatywnym rozwiązaniem jest stosowanie barwników fluorescencyjnych o dużo mniejszej specyficzności. Należą do nich związki interkalujące do dwuniciowego DNA. W wyniku tego oddziaływania w miarę wzrostu stężenia produktów reakcji PCR, obserwuje się wzrost fluorescencji o długości fali charakterystycznej dla danego barwnika. W związku z tym, że wykrywane jest dowolne dwuniciowe DNA, niezbędna jest dodatkowa informacja o tym, od jakich amplikonów pochodzi sygnał. Uzyskiwana jest ona na podstawie analizy krzywych topnienia produktów reakcji PCR. Parametr ten zależy przede wszystkim od ich długości oraz sekwencji. Na tej podstawie można określić czy powstające produkty są zgodne z oczekiwanymi (zgodność z teoretyczną temperaturą topnienia kalkulowaną w oparciu o znaną sekwencję DNA) (Schabereiter-Gurtner 2007) (Hsu i in. 2003). Najczęściej stosowanymi barwnikami fluorescencyjnymi są SYBR Green oraz EvaGreen. Brak specyficzności detekcji amplikonów nie jest jedynym problemem w przypadku stosowania różnego rodzaju barwników fluorescencyjnych. Kolejnym bardzo poważnym ograniczeniem jest inhibicja reakcji PCR, spowodowana obecnością barwników w mieszaninie reakcyjnej, co ma znaczący wpływ w przypadku identyfikacji patogenów występujących we krwi, gdzie czułość metody ma kluczowe znaczenie. Oddziaływanie barwnika z produktami reakcji PCR prowadzi również do przesunięć ich temperatury topnienia, która pozwala na weryfikację poprawności uzyskiwanych produktów amplifikacji oraz często na jej podstawie następuje identyfikacja gatunkowa

wykrywanego drobnoustroju. Istotnym ograniczeniem występującym głównie w przypadku złożonej reakcji *real time* PCR jest preferencyjne wiązanie się cząsteczek barwnika do różnych sekwencji amplikonów charakteryzujących się odmienną zawartością par GC. Może to skutkować tym, iż mimo uzyskiwania pożądanego produktu, sygnał od niego pochodzący będzie niezauważalny, gdyż barwnik preferencyjnie zwiąże się w większej ilości z innym produktem reakcji PCR (np. bogatszym w pary GC) (Gudnason 2007). Mechanizm detekcji oparty o barwinki fluorescencyjne powoduje, że istotnym staje się wybór odpowiedniego barwnika oraz jego stężenia (Ririe 1997). Ponadto, stężenie DNA w mieszaninie reakcyjnej również wpływa na oddziaływanie barwnika z DNA (Xu 2000). Obecnie prowadzi się badania nad coraz doskonalszymi barwnikami fluorescencyjnymi oraz ich zastosowaniem w reakcji *real-time*. Obiecująca jest grupa barwników SYTO, wśród których za najlepsze uznano SYTO-13 oraz SYTO-82 (Eischeid 2011).

Stosunkowo krótki czas trwania reakcji *real-time* PCR oraz wyższa czułość w porównaniu do standardowej reakcji PCR sprawia, że stała się ona bardzo dobrym narzędziem do diagnostyki inwazyjnych kandydoz. Jednak maksymalne wykorzystanie potencjału tej metody, wymaga starannego wyboru celu molekularnego. Obecnie powszechnie stosuje się sekwencje kodujące rRNA, co daje możliwość uzyskiwania wysokiej czułości stosowanych testów w detekcji DNA patogennych grzybów. W związku z dużym ryzykiem kontaminacji stosuje się drogie sondy, a ograniczanie ilości przeprowadzanych reakcji wiąże się z koniecznością wykorzystania aparatów pozwalających na wielokanałową detekcję sygnałów, które są poza możliwościami finansowymi publicznych ośrodków zdrowia nie tylko w Polsce.

Rozwój nowoczesnych metod w dziedzinie diagnostyki molekularnej umożliwia coraz doskonalszą identyfikację patogennych drobnoustrojów, w tym drożdżaków z rodzaju *Candida*, których znaczenie kliniczne ciągle wzrasta. Pomimo licznych zalet, do których należy przede wszystkim bardzo krótki czas analizy oraz znacznie wyższa czułość względem klasycznych metod opartych o hodowlę mikroorganizmów, wciąż nie znajdują one zastosowania w rutynowych badaniach. Nie zmienia tego nawet fakt, iż krytyczne parametry decydujące o przeżyciu pacjenta w przypadku kandydemii takie jak: czas oczekiwania na identyfikację patogenu oraz związane z tym możliwie najszybsze wdrożenie odpowiedniej antybiotykoterapii, preferują metody oparte o amplifikację DNA. Brak odpowiednich badań oraz walidacji umożliwiających wprowadzenie tego rodzaju diagnostyki do szpitali sugeruje, iż nie są one w pełni doskonałe. Spowodowane może być to tym, że na przestrzeni kilkunastu lat nastąpił bardzo dynamiczny rozwój metod

molekularnych, który bardziej nastawiony był na ich techniczny aspekt. Obecnie dostępne metody pozwalają na uzyskiwanie bardzo dobrych wyników związanych z diagnostyką różnego rodzaju zakażeń. Wciąż jednak posiadają wady, które wykluczają możliwość stosowania ich jako podstawowych i rutynowych testów diagnostycznych. Oprócz wysokich kosztów, które sukcesywnie maleją, należy tutaj zwrócić uwagę na ryzyko kontaminacji, które w przypadku tak bardzo czułych testów może skutkować uzyskiwaniem wyników fałszywie pozytywnych.

Biorąc pod uwagę wyżej wymienione spostrzeżenia, należy podejmować działania mające na celu poszukiwanie nowych specyficznych celów molekularnych, które nie niosłyby ze sobą tak wysokiego ryzyka kontaminacji. Ponadto, umożliwiłoby to stosowanie mniej specyficznych sposobów detekcji, co znacznie obniżyłoby koszty. Spełnienie tych warunków jest niezbędne, aby w przyszłości diagnostyka molekularna była podstawowym źródłem informacji o czynniku etiologicznym odpowiedzialnym za infekcje. Dzięki takim narzędziom możliwe będzie skuteczne leczenie pacjentów, co pozwoli obniżyć śmiertelność związaną z infekcjami układu krwionośnego wywoływanymi przez patogenne grzyby, a równocześnie przyniesie wymierne korzyści ekonomiczne. Należy bowiem pamiętać, iż oprócz wymiaru społecznego, kandydemie są przyczyną ogromnych nakładów finansowych związanych z przebywaniem pacjentów na oddziałach intensywnej opieki medycznej i poddawanych leczeniu farmaceutykami oraz niezdolnością pacjentów do pracy. Wciąż jednak nie znaleziono takiego rozwiązania, które znalazłoby zastosowanie w rutynowych badaniach mikrobiologicznych przeprowadzanych w szpitalach.

Zalety molekularnych metod diagnostycznych opartych na analizie kwasów nukleinowych:

- szybkość
- mniejsze ryzyko nieprawidłowej diagnozy, nieodpowiedniej terapii, przedawkowania antybiotyków, rozwoju lekooporności, redukcja kosztów leczenia
- czułość
- specyficzność
- możliwość analizy zmienności sekwencji
- wykrywanie mutacji powodujących lekooporność mikroorganizmów
- identyfikacja patogenów, dla których tradycyjne metody (hodowla, mikroskopia) są mało wiarygodne.

2.6. Projektowanie i optymalizacja reakcji PCR do diagnostyki

Zastosowanie reakcji PCR w diagnostyce molekularnej zakażeń, wiąże się z koniecznością poprawnego zaprojektowania starterów oligonukleotydowych, doboru i optymalizacji stężeń poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej oraz warunków temperaturowo-czasowych prowadzenia amplifikacji. Prawidłowe zaprojektowanie oraz wieloparametrowa optymalizacja reakcji PCR ma kluczowe znaczenie dla potencjału aplikacyjnego opracowanego układu w diagnostyce, a w szczególności wpływa na czułość oraz specyficzność reakcji PCR.

Jednym z najważniejszych etapów projektowania reakcji PCR jest dobór sekwencji starterów oligonukleotydowych. Przyjmuje się, że ich optymalna długość powinna mieścić się w przedziale 18-30 nukleotydów. Ważne jest, aby startery biorące udział w reakcji PCR miały zbliżoną temperaturę topnienia, co pozwoli na taki dobór temperatury przyłączania oligonukleotydów, który zapewni wysoką specyficzność reakcji oraz zbliżoną siłę oddziaływania każdego ze starterów z matrycowym DNA. Kluczowa w tym przypadku jest kompensacja zawartości par GC w sekwencji startera jego długością. Ważne jest, aby wybrane sekwencje były unikalne dla pożądanych gatunków drobnoustrojów, pozwoli to bowiem uniknąć wyników fałszywie pozytywnych lub negatywnych. Należy również zwrócić uwagę na występowanie drugorzędowych struktur tworzonych poprzez dwie cząsteczki starterów tego samego rodzaju (homodimer) oraz różnych (heterodimer). Ponadto należy zbadać możliwość występowania oddziaływań w obrębie jednej cząsteczki oligonukleotydu tzw. struktur typu szpilki do włosów (*hairpin*). Etap analizy opisanych oddziaływań wymaga określenia ich siły za pomocą wartości entalpii swobodnej, konieczna jest również jakościowa ocena powstałych struktur. Polega ona na zdefiniowaniu rodzaju wolnego końca w dwuniciowej strukturze, gdyż ma to wpływ na konsekwencje przebiegu reakcji amplifikacji. Wolny koniec 3' umożliwi dołączanie kolejnych nukleotydów przez polimerazę DNA, co zmieni sekwencję starterów w kolejnych cyklach amplifikacji i uniemożliwi ich specyficzną hybrydyzację oraz powstanie pożądanych produktów w reakcji PCR. Wolny koniec 5' nie będzie tworzył miejsca do rozpoczęcia reakcji polimeryzacji, co jest sytuacją korzystniejszą i nie powoduje modyfikacji starterów, niemniej jednak skutkuje niedostępnością cząsteczek dla specyficznych miejsc hybrydyzacji, przez co zostaje obniżona wydajność i czułość reakcji. Sytuacja komplikuje się w przypadku projektowania złożonych reakcji PCR, gdzie w mieszaninie reakcyjnej występuje więcej niż jedna para starterów oligonukleotydowych. Dla tego rodzaju reakcji należy wykonać analizę teoretycznego występowania wszystkich możliwych oddziaływań pomiędzy starterami (również tych

krzyżowych), a następnie wybrać najlepszy zestaw starterów, które w dalszej kolejności zostaną przetestowane empirycznie. Przyjmuje się, że wartość entalpii swobodnej oddziaływań typu szpilki do włosów nie powinna przekraczać -3 kcal/mol. W przypadku tworzenia dimerów starterów wartości te zależne są od tego czy występuje w danej strukturze dwuniciowej wolny koniec 3'. Jeżeli jest on obecny, to krytyczną wartością entalpii swobodnej jest -5 kcal/mol, a w innych konfiguracjach wartość ta kształtuje się na poziomie -6 kcal/mol. Kolejnym bardzo ważnym elementem w reakcji PCR jest polimeraza DNA. Jest to enzym katalizujący tworzenie wiązania fosfodiesterowego pomiędzy nukleotydami, a tym samym wydłużanie nici DNA na zasadzie komplementarności zasad. W związku z warunkami reakcji PCR stosowane polimerazy są enzymami termostabilnymi. Mimo tego, że różnego rodzaju polimerazy stosowane w reakcjach PCR mają wiele wspólnych cech, to jednak występują pomiędzy nimi znaczące różnice, które wpływają na działanie enzymu i określają potencjał zastosowania. Do podstawowych właściwości polimeraz DNA, które powinno się rozważyć należy zaliczyć: procesywność, szybkość przyłączania kolejnych nukleotydów, wierność, aktywności egzonukleolityczne w kierunku 3' do 5' i 5' do 3' oraz wrażliwość na inhibitory. Z punktu widzenia zastosowania w reakcjach diagnostycznych większość z tych cech ma znaczący wpływ na wybór odpowiedniej polimerazy.

Obecność aktywności egzonukleolitycznej w kierunku 3' do 5' czyli tzw. aktywności korektorskiej jest odpowiedzialna za wierność polimerazy, czyli ilość popełnianych przez nią błędów w postaci dołączania niekomplementarnych do matrycowej nici DNA nukleotydów. W przypadku klasycznych reakcji PCR sekwencja amplikonu nie podlega analizie, zatem błędnie przyłączone nukleotydy nie będą wpływały na poprawność identyfikacji poprzez określenie obecności i długości produktu PCR. Niemniej jednak, jeżeli wynikiem diagnostycznym jest sekwencja amplikonu lub wykrywanie powstających produktów reakcji za pomocą sond molekularnych, obecność niepoprawnych nukleotydów może prowadzić do błędnego wyniku diagnostycznego. W przypadku układów, w których znaczenie diagnostyczne mają pojedyncze nukleotydy na końcu 3' startera, aktywność korektorska polimerazy będzie skutkowałą amplifikacją nawet w przypadku niezgodności sekwencji na końcu startera, gdyż niesparowane nukleotydy zostaną usunięte i reakcja amplifikacji będzie mogła zajść. Przez to możliwe będzie otrzymywanie błędnych wyników. Obecność aktywności egzonukleolitycznej w kierunku 5' do 3' jest kluczowa w przypadku detekcji z zastosowaniem molekularnych sond hydrolizujących. Brak tej właściwości dla polimerazy uniemożliwi hydrolizę sondy i tym samym powstanie sygnału nawet w przypadku pozytywnego wyniku reakcji.

Wrażliwość polimerazy na inhibitory ma kluczowe znaczenie w przypadku analizy próbek klinicznych, w badaniu próbek żywności czy gleby. Są to materiały bardzo bogate w różnego rodzaju inhibitory polimeraz i niezbędny jest dobór odpowiedniej metody izolacja kwasów nukleinowych do przeprowadzenia reakcji diagnostycznej. Niższa drażliwość polimerazy na inhibitory może wyeliminować konieczność stosowania tego etapu, co przyspieszy procedurę diagnostyczną, a także podnosi czułość reakcji i prawdopodobieństwo uzyskania wyników fałszywie negatywnych.

Szybkość przyłączania nukleotydów przez polimerazę jest właściwością, która określa czas przeznaczony na wydłużanie amplikonu w trakcie cyklu reakcji. Wpływa to na szybkość przebiegu amplifikacji a tym samym procedury diagnostycznej, która powinna być jak najkrótsza.

Procesywność polimerazy związana jest z możliwością uzyskiwania długich fragmentów DNA. Jest to cecha, która nie ma kluczowego znaczenia przy doborze enzymu, gdyż w diagnostyce molekularnej nie stosuje się amplifikacji długich fragmentów.

Polimerazy oprócz swoich naturalnych właściwości mogą być modyfikowane w celu uzyskania dodatkowych cech takich jak tzw. *hot start*. Polega to na modyfikacji enzymu m.in. poprzez chemiczne zablokowanie miejsca aktywnego lub związanie z przeciwciałem w celu całkowitego pozbawienia polimerazy aktywności. Dzięki temu, w trakcie przygotowywania reakcji PCR, nie dochodzi do powstawania niespecyficznych produktów, zarówno na matrycy DNA jak i w wyniku oddziaływań ze sobą starterów. Przywrócenie aktywności polimerazy następuje poprzez inkubację w temperaturze denaturacji DNA. Tego rodzaju modyfikacja jest stosowana szczególnie do polimeraz wykorzystywanych w reakcjach *real-time* PCR, które charakteryzują się wysoką czułością i obecność niespecyficznej amplifikacji znacząco wpływa na wynik diagnostyczny, szczególnie przy stosowaniu barwników interkalujących.

Po zaprojektowaniu starterów do reakcji PCR oraz wybraniu odpowiedniej polimerazy należy przeprowadzić optymalizację składu mieszaniny reakcyjnej oraz opracować profil temperaturowo-czasowy reakcji. Kluczowymi elementami, których stężenie należy zoptymalizować to jony Mg^{2+} , które pełnią rolę kofaktora dla polimerazy, nukleotydów oraz ilość samej polimerazy w reakcji. Ważny jest też dobór odpowiedniego buforu reakcyjnego, który zapewni odpowiednie pH w trakcie reakcji oraz dostarczy jonów wpływających na działanie polimerazy oraz hybrydyzację starterów. W profilu temperaturowo-czasowym najważniejszymi parametrami są: temperatura przyłączania starterów oraz czas przeznaczony na wydłużanie amplikonu.

2.7. Problem inhibitorów w materiale diagnostycznego w reakcji PCR

W związku z tym, że technika PCR jest szeroko stosowanym narzędziem w diagnostyce molekularnej, znalazła zastosowanie w identyfikacji wielu patogenów takich jak wirusy (Dunn i in. 2014), bakterie (Jensen 2014) i grzyby (Lau 2013). Metoda ta jest również wykorzystywana w kryminalistyce (Costa Francez 2012) czy diagnostyce chorób genetycznych (Takeichi 2013). Reakcja PCR znajduje również zastosowanie w badaniu żywności w celu wykrywania ewentualnych drobnoustrojów patogennych (Mokhtari 2013) oraz organizmów modyfikowanych genetycznie (GMO) (Broeders 2012). W przypadku diagnostyki tego rodzaju materiałów stosowanie reakcji PCR może być ograniczone z powodu występowania szerokiej gamy inhibitorów, zarówno w próbkach biologicznych jak i żywności czy gleby. Różnego rodzaju związki, współwystępujące w badanych próbkach, mogą negatywnie wpływać na czułość i specyficzność reakcji PCR (Trombley i in. 2013). Mogą powodować lizę komórek, degradację kwasów nukleinowych (matrycy), lub mogą hamować bezpośrednio aktywność polimerazy. Wszystkie te oddziaływania skutkują niewydajną amplifikacją lub jej inhibicją (Wilson 1997). Dotychczas takie działanie wykazano dla wielu związków, do których należy zaliczyć: sole kwasów żółciowych, kompleksy polisacharydów (Lantz 1997) (Monteiro i in. 1997), kolagen w próbkach żywności (Kim 2001), hemoglobina i laktoferyna w próbkach krwi (Al-Soud 2001), związki humusowe w glebie (Straub 1995), melanina (Eckhart 2000), mioglobina (Belec 1998) w tkankach, polisacharydy w roślinach (Demeke 1992), proteiny (Powell i in. 1994) i jony wapnia (Bickley 1996) w mleku. Większość mechanizmów inhibicji powodowanych przez te związki ma związek z obniżeniem lub zahamowaniem aktywności polimerazy w mieszaninie reakcyjnej np. wapń, kolagen, hematyna oraz kwas taninowy (Opel 2010). Proteazy, detergenty, mocznik (Wilson 1997) (Saulnier 1992) fenol (Katcher 1994) obecne w próbkach prowadzą do degradacji enzymu (Powel 1994) (Rossen 1992). Melanina tworzy odwracalne kompleksy z DNA i polimerazą (Eckhart 2000). Polisacharydy naśladują strukturę kwasów nukleinowych, co prowadzi do zaburzeń w poprawnym przebiegu reakcji. Związki humusowe są w stanie oddziaływać zarówno z DNA jak i polimerazą, co skutkuje zahamowaniem reakcji nawet w przypadku minimalnych stężeń tych związków w mieszaninie reakcyjnej (Sultovic 2008). Mechanizm inhibicji reakcji PCR może również polegać na oddziaływaniu z kofaktorami polimeraz. Przykładem tego rodzaju inhibitorów mogą być jony wapnia, które kompetycyjnie wiążą się do polimerazy zamiast jonów magnezu. Innym przykładem jest kwas taninowy, który kompleksuje jony magnezu, co skutkuje brakiem jego dostępności dla polimerazy i przekłada się na spadek aktywności enzymu (Opel 2010). Inhibitory również mogą obniżać czułość reakcji *real-time* PCR poprzez oddziaływanie z fluoroforami obniżając

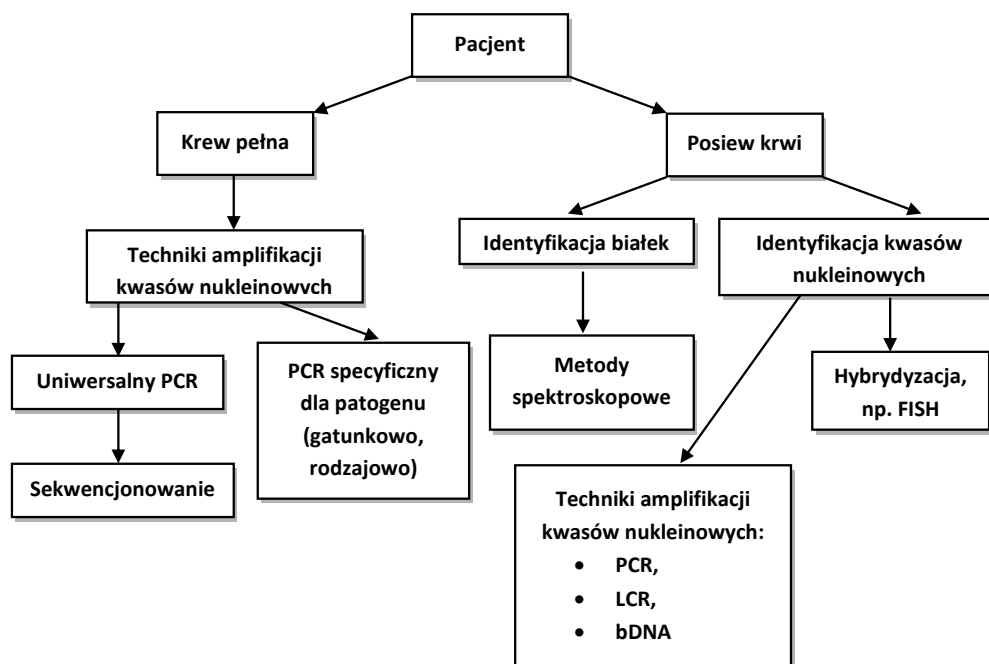
sygnał fluorescencji lub też podnosząc poziom tła (Schrader 2012). Jednym z podejść do eliminacji zjawiska inhibicji jest odpowiednie przygotowanie próbki do reakcji PCR poprzez dokładne oczyszczenie kwasów nukleinowych (Al-Soud 2000). Innymi stosowanymi rozwiązaniami są modyfikacje polimeraz poprzez wprowadzanie mutacji mających na celu wzrost ich odporności na inhibitory, konstrukcje polimeraz fuzyjnych i białek chimerycznych (Śpibida 2016). Najprostszym jednak rozwiązaniem jest opracowywanie nowych składów buforów reakcyjnych, których zadaniem jest niwelowanie wpływu inhibitorów wprowadzanych do reakcji poprzez dodanie tzw. wzmacniaczy reakcji PCR (Al-Soud 2000).

2.8. Inne metody wykrywania *Candida* z pozytywnych próbek krwi

Obecnie dostępnych jest coraz więcej nowych metod do identyfikacji patogenów (w tym drożdżaków z rodzaju *Candida*) odpowiedzialnych za wywoływanie infekcji układu krwionośnego. Do tej grupy zalicza się między innymi mikromacierze DNA, które umożliwiają badanie w kierunku kilkudziesięciu patogenów w trakcie jednej analizy. Identyfikacja polega na przeprowadzeniu reakcji PCR i identyfikacji pozytywnych sygnałów dla immobilizowanych na mikromacierzy sond specyficznych wobec każdego identyfikowanego gatunku oddzielnie (Sakai 2012). Inną metodą, ostatnio dosyć popularną w identyfikacji drobnoustrojów, jest spektrometria mas z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI TOF - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of Flight*). MALDI TOF może być stosowana w połączeniu z elektroforezą dwuwymiarową lub może stanowić samodzielną metodę identyfikacji białek badanych proteomów. System ten daje możliwość szybkiej identyfikacji bakterii oraz grzybów. Warunkiem jest jednak pozyskanie czystych kultur drobnoustrojów.

Otrzymany profil białkowy umożliwia identyfikację drobnoustrojów obecnych w próbce na podstawie analizy porównawczej z dostępnymi bazami danych. Inne podejście reprezentuje metoda PNA FISH wykorzystująca sondy molekularne o budowie kwasów peptydonukleinowych będących analogami DNA i RNA. Tego rodzaju sonda jest w stanie tworzyć struktury dwuniciowe na podstawie komplementarności zasad analogicznie do kwasów nukleinowych. Oddziaływanie z matrycowymi DNA lub RNA jest jednak stabilniejsze w porównaniu ze standardowymi sondami będącymi fragmentami DNA lub RNA, ponieważ w szkielecie sondy PNA nie występują ujemnie naładowane reszty kwasu fosforowego, przez co nie dochodzi do odpychania elektrostatycznego

z cząsteczkami kwasów nukleinowych, względem których sonda jest specyficzna. Identyfikacja pozytywnego sygnału z sondy możliwa jest dzięki jej fluorescencyjnemu wyznakowaniu. Badanie może być wykonywane na szkiełku mikroskopowym bezpośrednio z materiału klinicznego np. z kropli krwi. Pozytywny wynik względem określonej sondy obserwowany jest w mikroskopie fluorescencyjnym. Do projektowania sond wykorzystywane są specyficzne gatunkowo sekwencje kodujące rRNA. Schemat przedstawiający metody stosowane do identyfikacji zakażeń krwi przedstawia rycina nr 13.



Rycina 13 Techniki wykorzystywane do identyfikacji patogenów z próbek krwi.⁶

Dotychczas w większości metod diagnostycznych jako cele molekularne wykorzystywane są geny znajdujące się w obrębie operonu rybosomalnego wraz z regionami niekodującymi. Spowodowane jest to głównie przez dwa czynniki: dostępność bardzo dużej liczby sekwencji dla większości drobnoustrojów oraz wielokopijność tych sekwencji przez co wzrasta czułość identyfikacji. Pomimo mnogości i różnorodności metod wykorzystywanych do identyfikacji patogenów z próbek krwi wciąż nie znaleziono idealnego rozwiązania, które zastąpiłoby złoty standard mikrobiologii czyli metody hodowlane i testy biochemiczne, dlatego wciąż poszukiwane są nowe cele molekularne i opracowywane nowe metody i sposoby przygotowywania próbek do analizy (szczególnie metody wydajnej ekstrakcji pozbawionego inhibitorów DNA).

⁶ Źródło: zmodyfikowano (Peters, 2004)

3. Cel pracy

Celem pracy była konstrukcja układów diagnostycznych do rodzajowej i gatunkowej identyfikacji drożdżaków *Candida* w oparciu o nowe cele molekularne z wykorzystaniem metod opartych o amplifikację kwasów nukleinowych.

4. Materiały i metody

4.1. Szczepy referencyjne *Candida* spp.

Badania prowadziłem z wykorzystaniem szczepów należących do różnych gatunków z rodzaju *Candida*. Szczepy mikroorganizmów pochodziły z kolekcji ATCC (*American Type Culture Collection*), które zostały zakupione przez Katedrę Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej. Tabela nr 10 zawiera wykaz stosowanych szczepów referencyjnych zakupionych z kolekcji ATCC.

Tabela 10 Wykaz szczepów referencyjnych używanych do badań.

L.p.	Opis
1	<i>C. albicans</i> ATCC 90029
2	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
3	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
4	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750
5	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001
6	<i>C. dubliniensis</i> MYA-646
7	<i>C. kefyr</i> ATCC 02512
8	<i>C. guilliermondii</i> ATCC 6260

4.2. Szczepy bakteryjne

Szczepy bakteryjne w pracy wykorzystywałem do badania specyficzności opracowanych układów diagnostycznych. Wykaz stosowanych szczepów bakteryjnych zawiera tabela nr 11.

Tabela 11 Wykaz szczepów bakterii.

L.p.	Opis
1	<i>Serratia marcescens</i>
2	<i>Enterococcus faecalis</i>
3	<i>Enterococcus faecium</i>
4	<i>Klebsiella oxytoca</i>
5	<i>Escherichia coli</i>
6	<i>Acinetobacter baumannii</i>
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8	<i>Staphylococcus aureus</i>

4.3. Szczepy kliniczne *Candida* spp.

Do badań wykorzystałem 97 preparatów klinicznych poddanych badaniu w kierunku drożdżaków, które otrzymałem w wyniku realizacji 3 miesięcznego stażu w Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Szczepy izolowane były od pacjentów w ramach rutynowych badań prowadzonych w laboratorium. Do badań uzyskałem: 45 szczepów *C. albicans*, 14 szczepów *C. glabrata*, 8 szczepów *C. krusei*, 2 szczepy *C. tropicalis*, po

1 szczepie *C. kefyry*, *C. norwengensis* i *Saccharomyces cerevisiae* oraz 33 szczepy zidentyfikowane do rodzaju *Candida*. W przypadku tych próbek nie była prowadzona dalsza procedura diagnostyczna w celu przypisania do gatunku, gdyż identyfikacja rodzajowa z danego materiału klinicznego była wystarczająca do podjęcia odpowiednich procedur medycznych. Tabela nr 12 przedstawia zestawienie próbek klinicznych wraz ze zidentyfikowanym rodzajem/gatunkiem drożdżaków oraz przypisanym numerem porządkowym.

Tabela 12 Wykaz klinicznych szczepów drożdżaków.

Lp.	Zidentyfikowany rodzaj/gatunek	Lp.	Zidentyfikowany rodzaj/gatunek
1	<i>C. albicans</i>	28	<i>C. albicans</i>
2	<i>C. albicans</i>	29	<i>C. albicans</i>
3	<i>C. albicans</i>	30	<i>C. albicans</i>
4	<i>C. albicans</i>	31	<i>C. albicans</i>
5	<i>C. albicans</i>	32	<i>Candida</i> sp.
6	<i>C. glabrata</i>	33	<i>Candida</i> sp.
7	<i>C. glabrata</i>	34	<i>Candida</i> sp.
8	<i>C. glabrata</i>	35	<i>C. krusei</i>
9	<i>Candida</i> sp.	36	<i>Candida</i> sp.
10	<i>C. albicans</i>	37	<i>Candida</i> sp.
11	<i>Candida</i> sp.	38	<i>C. glabrata</i>
12	<i>C. albicans</i>	39	<i>C. tropicalis</i>
13	<i>C. albicans</i>	40	<i>Candida</i> sp.
14	<i>Candida</i> sp.	41	<i>Candida</i> sp.
15	<i>C. krusei</i>	42	<i>Candida</i> sp.
16	<i>C. albicans</i>	43	<i>Candida</i> sp.
17	<i>Candida</i> sp.	44	<i>Candida</i> sp.
18	<i>C. albicans</i>	45	<i>C. krusei</i>
19	<i>C. albicans</i>	46	<i>C. glabrata</i>
20	<i>C. albicans</i>	47	<i>C. glabrata</i>
21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48	<i>C. albicans</i> i <i>C. glabrata</i>
22	<i>Candida</i> sp.	49	<i>C. kefyry</i>
23	<i>Candida</i> sp.	50	<i>C. krusei</i>
24	<i>C. glabrata</i>	51	<i>C. glabrata</i>
25	<i>Candida</i> sp.	52	<i>C. albicans</i> i <i>C. krusei</i>
26	<i>C. albicans</i> i <i>C. krusei</i>	53	<i>Candida</i> sp.

27	<i>C. albicans</i>	54	<i>Candida</i> sp.
55	<i>C. krusei</i>	91	<i>C. albicans</i> i <i>C. norvengensis</i>
56	<i>Candida</i> sp.	92	<i>Candida</i> sp.
57	<i>C. albicans</i>	93	<i>Candida</i> sp.
58	<i>C. albicans</i>	94	<i>Candida</i> sp.
59	<i>C. albicans</i>	95	<i>Candida</i> sp.
60	<i>Candida</i> sp.	96	<i>C. albicans</i> i <i>C. glabrata</i>
61	<i>C. albicans</i>	97	<i>C. glabrata</i>
62	<i>C. albicans</i>		
63	<i>C. albicans</i>		
64	<i>Candida</i> sp.		
65	<i>C. albicans</i>		
66	<i>C. albicans</i> i <i>C. krusei</i>		
67	<i>C. albicans</i>		
68	<i>Candida</i> sp.		
69	<i>C. albicans</i>		
70	<i>C. albicans</i>		
71	<i>C. albicans</i>		
72	<i>C. albicans</i>		
73	<i>C. albicans</i>		
74	<i>C. albicans</i>		
75	<i>C. albicans</i>		
76	<i>C. albicans</i>		
77	<i>Candida</i> sp.		
78	<i>C. albicans</i>		
79	<i>C. albicans</i>		
80	<i>C. albicans</i>		
81	<i>C. glabrata</i>		
82	<i>Candida</i> sp.		
83	<i>C. glabrata</i>		
84	<i>Candida</i> sp.		
85	<i>C. albicans</i>		
86	<i>Candida</i> sp.		
87	<i>Candida</i> sp.		
88	<i>C. albicans</i> i <i>C. tropicalis</i>		
89	<i>Candida</i> sp.		

4.4. Pożywki i podłoża hodowlane

- Sabouraud Dextrose Broth – EMAPOL Sp. z o.o.
- Sabouraud Dextrose Agar – EMAPOL Sp. z o.o.
- ChromAgar Candida – EMAPOL Sp. z o.o.
- Podłoże LB (1% trypton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt drożdżowy)
- Podłoże LA (1% trypton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 1,5% agar)

4.5. Bufory

- Bufor TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA)
- Bufor Shark 10x do reakcji PCR (BLIRT S.A.)
- Bufor TaqNova KCl 10x (BLIRT S.A.)
- Bufor TaqNova (NH₄)₂SO₄ 10x (BLIRT S.A.)
- Bufor Tango 10x (Thermo Fisher Scientific)
- Bufor TAE 50x do elektroforezy agarozowej
 - 242g Tris
 - 57,1 ml lodowatego kwasu octowego
 - 0,5 g EDTA
 - woda destylowana do objętości końcowej 1000 ml
- Bufor TBE 10x do elektroforezy poliakryloamidowej
- Bufor obciążający do nanoszenia próbek na żel Green6x (BLIRT S.A.)

4.6. Polimerazy DNA

- Polimeraza Hypernova 2U/μl (BLIRT S.A.)
- Polimeraza TaqNova 2U/μl (BLIRT S.A.)
- OmniKlenTaq (DNA PolymeraseTechnology)

4.7. Master Mix *real-time* PCR

- Fast Start MasterMix Sybr Green (Roche)

4.8. Startery oligonukleotydowe do reakcji PCR

Startery zakupione były w firmie BLIRT S.A. Wykaz stosowanych starterów przedstawia tabela nr 13.

Tabela 13 Wykaz starterów oligonukleotydowych

Nazwa	Sekwencja	Długość [nt]	Zawartość GC [%]	Temperatura topnienia [°C]
LysF	5'- AGA GAA GGT GAA CAA TTT GC -3'	20	40	50,9
LysFluo	Fluoresceine -5'- AGA GAA GGT GAA CAA TTT GC -3'	20	40	50,9
LysR1	5'- AAT GGC ATT CCA ACC AGT CAA TCT -3'	24	41,7	57,2
LysR2	5'- AAA TTC AAT TGA TCA ACT CT -3'	20	25	45
SynReal	5'- CCA ACA GTA TCA GCA ATA CCA ACT CT -3'	26	42,3	56,8
AcoF	5'- GGC AAA TTA TCT GGA TGG AGC TCG CCT -3'	27	51,9	62,5
AcoR	5'- TTT CAA CCA GAC ACC AGC TGC -3'	21	52,4	58,2
ParFks1	5'- AGA GGT CGA GGA GGT ACA TCT CG -3'	23	56,5	59,3
ParFks2	5'- CGG TAC ATC TCA TTG TGG TCT TTG -3'	24	45,8	55,8
AcoRealF	5'- GGC AAA TTA TCT GGA TGG AGC TCG CCT -3'	27	51,9	62,5
AcoRealR	5'- CCT CCT CTG ACG GTC AAA ATA CCT GC -3'	26	52,8	60,9
ParRealF	5'- GGG AAT AGA GAT TCG TTT CTC CAG -3'	24	45,8	54,8
ParRealR	5'- TGT ACG ATA GAT GTT CAA CAA G -3'	22	36,4	50,2
EnoF	5'- TGC CAT TCT TGG TGT CTC CC -3'	20	55	57,4
EnoR	5'- AAG CAT CCT TGG AAC CGG AG -3'	20	55	57,4
18SF	5'- ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG -3'	20	55	57,5
18SR	5'- CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG -3'	20	60	56,7

4.9. Pozostałe roztwory i odczynniki

- agaroz – “Agarose Plus” (PRONA)
- bromek etydyny roztwór 5mg/ml (Sigma Aldrich)
- roztwór MgCl₂ 25mM (BLIRT S.A.)
- trifosforany dezoksyrybonukleotydów (dNTPs) 8 mM (BLIRT S.A.)
- 30% roztwór poliakrylamidów (29g akrylamidy i 1g bisakrylamidów)
- TEMED

- 10% nadsiarczan amonu

4.10. Enzymy restrykcyjne

- *DraI* 10 U/ μ l (Thermo Fisher Scientific)
- *RsaI* 10 U/ μ l (Thermo Fisher Scientific)
- *BglII* 10 U/ μ l (Thermo Fisher Scientific)

4.11. Materiały podstawowe

- probówki typu Eppendorf (0.5, 1.5, 2.0 ml)
- cienkościenne probówki typu Eppendorf do reakcji PCR (0,2 ml)
- końcówki do pipet automatycznych
- szklane probówki
- falkony plastikowe

Wszystkie materiały były sterylizowane w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 min pod ciśnieniem 1,5 atm.

4.12. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- aparat do elektroforezy agarozowej - Cleaver
- aparat do pomiaru stężenia DNA – NanoDrop ND-1000
- autokław
- cieplarka – Nuve
- mieszadło magnetyczne
- pH-metr- CP-401 *ELMTRON*
- pipety automatyczne – *Eppendorf*
- termoblok - *Grant*
- termocykler- Mastercykler's Eppendorf
- transiluminator – Spectraline Ultraviolet 312 mmUV
- waga elektroniczna – AD300 Axis
- wirówka – Eppendorf 5415R
- wortex- VL-I
- Versa Doc Imagine System Model 1000 – BIO-RAD
- wytrząsarka 2002 – DNA Gdańsk
- zasilacz do elektroforezy – Electrophoresis Power Supply EPS601

- komory do nastawiania reakcji PCR:
 - Captairbio Erlab
 - Scie-Plas UV4PCR
- komora laminarna do pracy z drobnoustrojami – Thermoscientific MSC-ADVANTAGE
- Termocykler real-time Roche LightCycler2.0
- Termocykler real-time MyGo ITS

4.13. Zestawy do izolacji DNA

- Zestaw do izolacji genomowego DNA – Gene Matrix Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification KIT – EURx
- Zestaw do izolacji DNA z wymazów - ExtractMe Swab & Semen DNA Purification KIT - BLIRT S.A.

4.14. Programy komputerowe

- CLC Sequence Viewer 7
(<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-sequence-viewer/>)
- Quantity One ver. 4.3.1
- Microsoft Digital Image 2006 Standard Edition
- NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Multi Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific)

4.15. Hodowle drobnoustrojów

Hodowle drożdżowe na podłożu stałym

Hodowle prowadziłem na podłożu Sabouraud Dextrose Agar (EMAPOL Sp. z o.o.) przygotowanym zgodnie z instrukcją producenta w temperaturze 30°C przez 48h.

Hodowle drożdżowe na podłożu płynnym

Hodowle prowadziłem na podłożu Sabouraud Dextrose Broth (EMAPOL Sp. z o.o.) przygotowanym zgodnie z instrukcją producenta w temperaturze 30°C przez 48h, 200 rpm.

Hodowle bakteryjne na podłożu stałym

Hodowle prowadziłem na podłożu LA w temperaturze 37°C przez 24h.

Hodowle bakteryjne na podłożu płynnym

Hodowle prowadziłem na podłożu LB w temperaturze 37°C przez 24h, 200 rpm.

4.16. Izolacja genomowego DNA

Izolację DNA z drożdży oraz bakterii przeprowadziłem zgodnie z protokołem producenta zestawu do oczyszczania DNA firmy Eurx S.A. Izolację ludzkiego DNA przeprowadziłem zgodnie z protokołem producenta firmy BLIRT S.A. Pomiaru stężenia i czystości DNA dokonałem na spektrofotometrze Nano-Drop ND-1000. Uzyskałem stężenie DNA w zakresie 20-40 ng/μl dla drożdży, 30-50 ng/μl dla bakterii oraz 25 ng/μl dla DNA ludzkiego.

4.17. Elektroforeza agarozowa

Elektroforezę agarozową prowadziłem w buforze 1xTAE w żelu agarozowym o stężeniu 1,2% przy napięciu 7V/cm przez 45 min. Wizualizacji żelu dokonywałem w świetle UV o długości 312 nm.

4.18. Elektroforeza poliakrylamidowa

Elektroforezę poliakrylamidową prowadziłem w buforze 1xTBE w żelu poliakrylamidowym o stężeniu 12% przy napięciu 7V/cm przez 5 h.

Wizualizacji żelu dokonywałem w świetle UV o długości 312 nm.

4.19. Reakcja *touchdown* PCR do wykrywania pan-*Candida*

Tabela 14 Skład mieszaniny w reakcji *touchdown* PCR do wykrywania pan-*Candida*.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w reakcji PCR
bufor Shark 10x	2,5	1x
dNTPs [8mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25mM]	2,5	2,5 mM
starter LysF [10μM]	1	0,4 μM
starter LysR2 [10μM]	1	0,4 μM
polimeraza Pwo [2U/μl]	0,5	0,04 U/μl
woda	14	-
DNA [20-30 ng/μl]	1	0,8-1,2 ng/μl

Tabela 15 Profil temperaturowo-czasowy reakcji touchdown PCR do wykrywania pan-*Candida*.

Temperatura [°C]	Obniżenie temp. w każdym cyklu [°C]	Czas	Liczba cykli
94		2 min	
94		45s	
72	-1	30s	3 cykle
72		1 min	
94		45s	
69	-0,5	30s	3 cykle
72		1 min	
94		45s	
67		30s	10 cykli
72		1 min	
94		45s	
67	-0,5	30s	8 cykli
72		1 min	
94		45s	
63		30s	15 cykli
72		1 min	
72		3 min	

4.20. Reakcja *real-time* do wykrywania pan-*Candida*

Master Mix Sybr Green firmy Roche zawiera barwnik interkalujący Sybr Green dzięki któremu możliwa była identyfikacja powstających produktów reakcji PCR zgodnie z parametrami detekcji dla kanału FAM.

Tabela 16 Skład mieszaniny reakcyjnej do wykrywania pan-*Candida* za pomocą reakcji *real-time* PCR.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	12	-
MgCl ₂ [25mM]	2	2,5 mM
LYSF [10μM]	1	0,5 μM
LYSReal [10μM]	1	0,5 μM
Master SYBR Green	2	1x
matrycowe DNA [1-5 ng/μl]	2	0,1-0,5 ng/μl

Tabela 17 Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR do wykrywania pan-*Candida*.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
95	600	
95	10	
62	20	45
72	10	

4.21. Metoda t-RFLP do identyfikacji gatunkowej 6 klinicznie istotnych drożdżaków z rodzaju *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*)

Amplifikacja fragmentu genu syntazy homocytrynianowej

Tabela 18 Skład mieszaniny reakcyjnej dla układu diagnostycznego opartego o metodę t-RFLP.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w reakcji PCR
bufor Shark 10x	5	1x
dNTPs [8mM]	5	0,8 mM
MgCl ₂ [25mM]	5	2,5 mM
starter LysFluo [10μM]	1	0,4 μM
starter SynReal [10μM]	1	0,4 μM
polimeraza Pwo [2U/μl]	2	0,08 U/μl
woda	29	-
DNA [20-30 ng/μl]	2	0,8-1,2 ng/μl

Tabela 19 Profil temperaturowo-czasowy reakcji dla układu diagnostycznego opartego o metodę t-RFLP.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
94	120	
94	30	
55	30	40
72	30	
72	180	

Trawienie produktów amplifikacji

Po reakcji amplifikacji przygotowywałem 3 mieszaniny reakcyjne dla każdego enzymu (*RsaI*, *BglII*, *DraI*) oddzielnie.

Tabela 20 Skład mieszanin reakcyjnych do trawienia restrykcyjnego produktów reakcji PCR.

Odczynnik	Objętość [μl]
bufor Tango 10x	2/4/2
Woda	2,5/0,5/2,5
<i>RsaI/BglII/DraI</i>	0,5/0,5/0,5
Mieszanina po reakcji amplifikacji	15/15/15

Trawienie prowadziłem w temperaturze 37°C przez 1h.

Produkty trawienia rozdzielałem za pomocą elektroforezy w 12% żelu poliakrylamidowym.

4.22. Metoda złożonej reakcji PCR do identyfikacji 5 klinicznie istotnych gatunków z rodzaju *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*)

Tabela 21 Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji 5 celów molekularnych w reakcji multipleks PCR.

Odczynniki	Objętość [μ l]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
bufor TaqNova KCl 10x	2,5	1x
dNTPs [8mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25mM]	2,5	2,5 mM
EnoF [10 μ M]	1	0,4 μ M
EnoR [10 μ M]	1	0,4 μ M
AcoF [10 μ M]	0,5	0,2 μ M
AcoR [10 μ M]	0,5	0,2 μ M
GlaF [10 μ M]	1	0,4 μ M
GlaR [10 μ M]	1	0,4 μ M
TropF [10 μ M]	1	0,4 μ M
TropR [10 μ M]	1	0,4 μ M
Parfks1F [10 μ M]	1	0,4 μ M
Parfks1R [10 μ M]	1	0,4 μ M
polimeraza TaqNova [2U/ μ l]	0,5	0,04 U/ μ l
woda	7	-
matrycowe DNA [19-31ng/ μ l]	1	0,76-1,24 ng/ μ l

Tabela 22 Profil temperaturowo-czasowy reakcji multipleks PCR do wykrywania 5 gatunków *Candida*.

Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas [s]	Cykle
94	120	
94	30	
62	30	30
72	60	
72	180	

Produkty amplifikacji rozdzielałem za pomocą elektroforezy w 1,2% żelu agarozowym.

4.23. Reakcja *real-time* do do identyfikacji 5 klinicznie istotnych gatunków z rodzaju *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*)

Tabela 23 Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do identyfikacji gatunkowej pięciu drożdżaków z rodzaju *Candida* za pomocą *real-time* PCR.

Odczynniki	Objętość [μ l]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	12	-
MgCl ₂ [25mM]	2	2,5 mM
Starter <i>forward</i> [10 μ M]	1	0,5 μ M
Starter <i>reverse</i> [10 μ M]	1	0,5 μ M
Master SYBR Green 10x	2	1x
matrycowe DNA	2	-

Tabela 24 Profil temperaturowo-czasowy reakcji Real-time PCR do identyfikacji gatunkowej *Candida*.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
95	600	
95	10	
62	10	30
72	20	

5. Wyniki i dyskusja

W dalszej części rozprawy przedstawię wyniki dotyczące opracowanych układów diagnostycznych do identyfikacji gatunkowej klinicznie znaczących drożdżaków z rodzaju *Candida*. Pierwsza część pracy dotyczy opracowania układów diagnostycznych przeznaczonych do identyfikacji rodzajowej i gatunkowej klinicznie znaczących drożdżaków *Candida* spp. Przedstawiłem informacje dotyczące genów, wybranych jako nowe cele molekularne oraz opisałem kryteria doboru sekwencji starterów oligonukleotydowych tak, aby wykazywały specyficzność rodzajową i gatunkową w reakcji amplifikacji. Po przeprowadzeniu analizy teoretycznej przedstawiłem również proces optymalizacji warunków przebiegu reakcji PCR, a następnie zoptymalizowane układy zweryfikowałem na referencyjnych szczepach *Candida* spp.

Druga część pracy dotyczy weryfikacji opracowanych układów diagnostycznych na szczepach klinicznych. Ich identyfikacja gatunkowa została przeprowadzona w Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za pomocą podłoży chromogennych oraz analizy biochemicznej. Na podstawie tych wyników określiłem poprawność identyfikacji gatunkowej z wykorzystaniem opracowanych w ramach realizacji pracy doktorskiej nowych układów diagnostycznych.

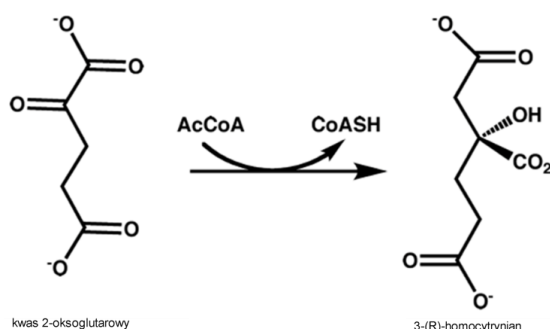
Ostatni etap pracy podejmuje problem inhibitorów obecnych w materiałach diagnostycznych, które stanowią problem w reakcji PCR. Przede wszystkim skupiłem się na inhibitorach obecnych w próbkach krwi, z powodu istotności z punktu widzenia diagnostyki zakażeń. W wyniku przeprowadzonych badań opracowałem własny zestaw odczynników do układów diagnostycznych powstałych w wyniku realizacji pracy doktorskiej, co stanowi podstawę do opracowania prototypów zestawów diagnostycznych wykorzystując nowe cele molekularne do diagnostyki *Candida* spp.

5.1. Układy diagnostyczne oparte o gen syntazy homocytrynianowej

Na podstawie analizy piśmiennictwa opisującego białka charakterystyczne dla grzybów oraz drożdży wybrałem gen syntazy homocytrynianowej jako cel molekularny do opracowania układów diagnostycznych służących identyfikacji pan-*Candida*, jak również do identyfikacji gatunkowej klinicznie znaczących drożdżaków z rodzaju *Candida* takich jak: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* oraz *C. dubliniensis*. Syntaza homocytrynianowa kodowana przez gen *lys21* katalizuje pierwszy etap szlaku biosyntezy lizyny u grzybów i niektórych *Archaea*. W pracy Kur i in. gen ten jest zaproponowany jako potencjalny cel molekularny dla nowych kandydatów na związki antygrzybiczych (Kur 2010).

Synteza lizyny u żywych organizmów odbywa się za pomocą dwóch ścieżek tj. poprzez kwas diaminopimelinowy u roślin i bakterii oraz poprzez kwas α -aminoadypinowy u drożdży i innych grzybów, w tym dla gatunków patogennych dla ludzi. W związku z tym, iż ssaki są auktotrofami lizynowymi, to nie posiadają niektórych enzymów produkowanych przez drożdżaki. Jednym z tych enzymów jest właśnie syntaza homocytrynianowa, która jest rozważana jako cel molekularny dla leków przeciwożybiczych. Mechanizm działania syntazy homocytrynianowej polega na przeniesieniu grupy acetylowej z acetylokoenzymu A na kwas 2-oksoglutaryny (Rycina nr 19).

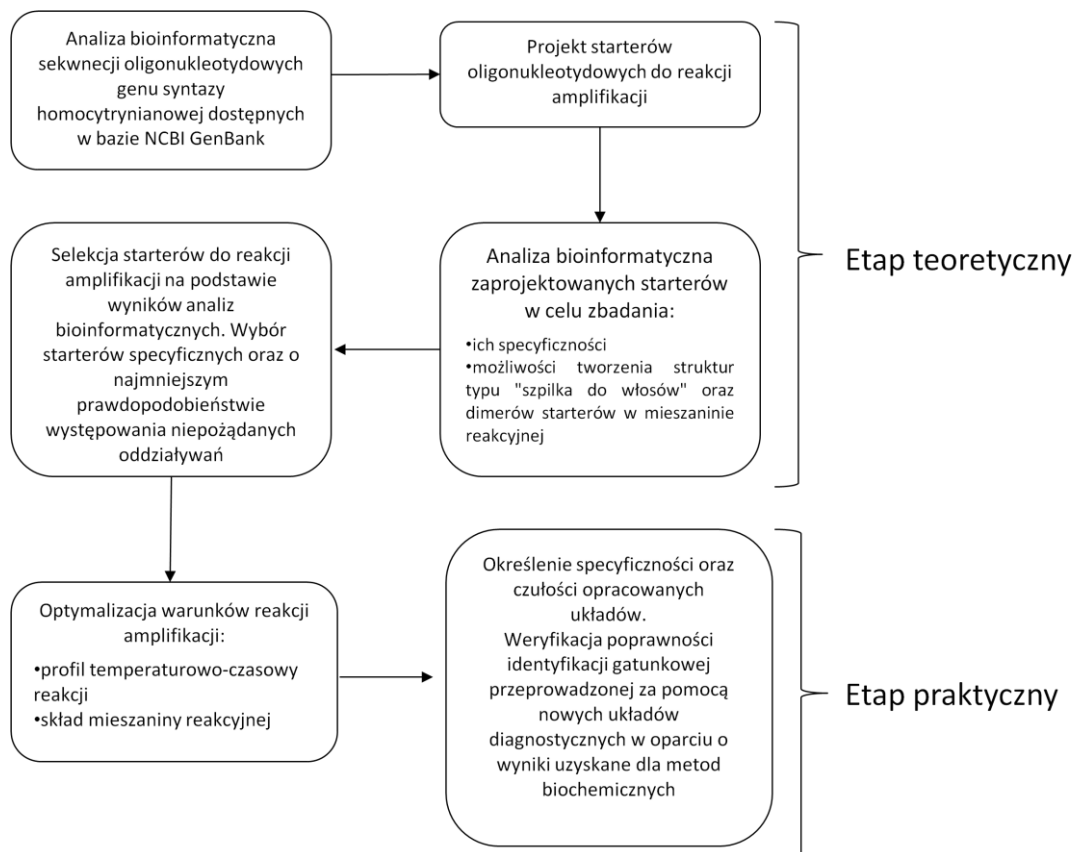
Ze względu na powszechność występowania genu kodującego syntazę homocytrynianową również u drożdżaków z rodzaju *Candida* został on wybrany jako marker molekularny do konstrukcji testu diagnostycznego .



Rycina 14 Schemat reakcji katalizowanej przez syntazę homocytrynianową.

Schemat postępowania w przypadku tworzenia układu opartego o nowy cel molekularny jakim jest gen syntazy homocytrynianowej przedstawiłem poniżej na rycinie nr 15.





Rycina 15 Schemat tworzenia układów diagnostycznych opartych o sekwencje genu syntazy homocytrynianowej.

5.1.1. Analiza bioinformatyczna sekwencji genu syntazy homocytrynianowej

Analizy bioinformatycznej genu syntazy homocytrynianowej dokonałem w oparciu o sekwencje dostępne w bazie NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sekwencja nukleotydowa genu syntazy homocytrynianowej dostępna była dla następujących gatunków *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* oraz *C. dubliniensis*. W przypadku tych drożdżaków dostępne są dwie sekwencje kodujące gen syntazy homocytrynianowej. Wynika to z obecności dwóch izoschizomerów tego enzymu.

Korzystając z oprogramowania CLC Sequence Viewer 7 sporządziłem analizę porównawczą (*alignment*) sekwencji genów różnych gatunków grzybów: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Lodderomyces elongisporus*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia pastoris*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Arthroderma otae*, *Arthroderma gypseum*, *Neurospora crassa*, *Coprinopsis cinerea*, *Coccidioides posadasii*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans*, *Ajellomyces capsulatus*, *Clostridium cellulovorans*, *Anabaena variabilis*, *Epichloe festucae*, *Aspergillus niger*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*. Celem pracy było zlokalizowanie obszarów zakonserwowanych ewolucyjnie, które miały posłużyć

w opracowaniu specyficznych starterów dla wybranych gatunków drożdżaków takich jak *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*. Gatunki te odpowiedzialne są za ponad 95% infekcji wywoływanych przez drożdżaki z rodzaju *Candida* co stanowiło kryterium ich wyboru do opracowania zestawu diagnostycznego.

W wyniku analizy dostępnych sekwencji nukleotydowych genu syntazy homocytrynianowej dla grzybów z rodzaju *Candida* otrzymałem wyniki, które przedstawia tabela nr 25.

Tabela 25 Analiza sekwencji nukleotydowej genów syntazy homocytrynianowej dla poszczególnych gatunków drożdżaków z rodzaju *Candida*.

Nukleotyd [liczba/%]	<i>C.glabrata</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
C+G	579/44	449/35	453/35	412/33
A+T	735/56	835/65	834/65	842/67
Długość genu [pz]	1314	1284	1287	1254

Długość genu syntazy homocytrynianowej jest podobna dla wszystkich, dostępnych w bazie gatunków z rodzaju *Candida* i wynosi około 1300 pz. Zawartość procentowa par C+G i A+T jest podobna dla *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* oraz *C. albicans*, natomiast sekwencja genu pochodzącego od *C. glabrata* jest bogatsza w pary GC względem pozostałych trzech gatunków.

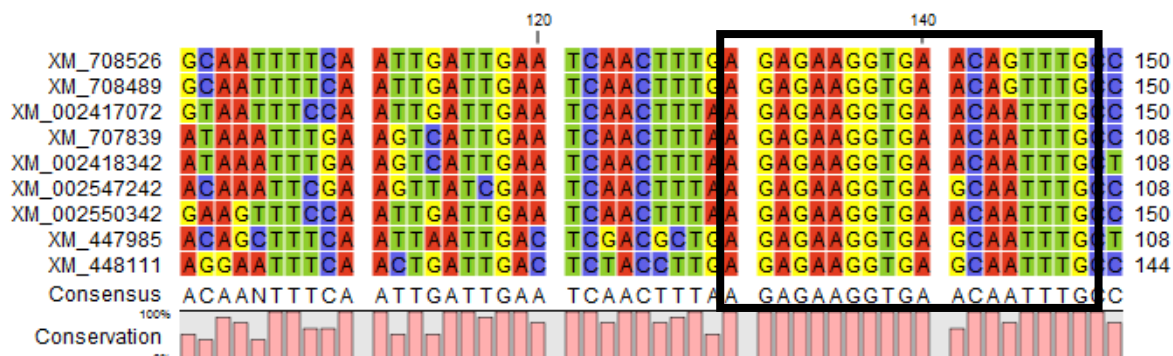
5.1.2. Specyficzna identyfikacja pan-*Candida*

Gen syntazy homocytrynianowej został wybrany jako cel molekularny do wykrywania wszystkich klinicznie istotnych gatunków z rodzaju *Candida* bez ich identyfikacji gatunkowej czyli dla tzw. układu pan-*Candida*.

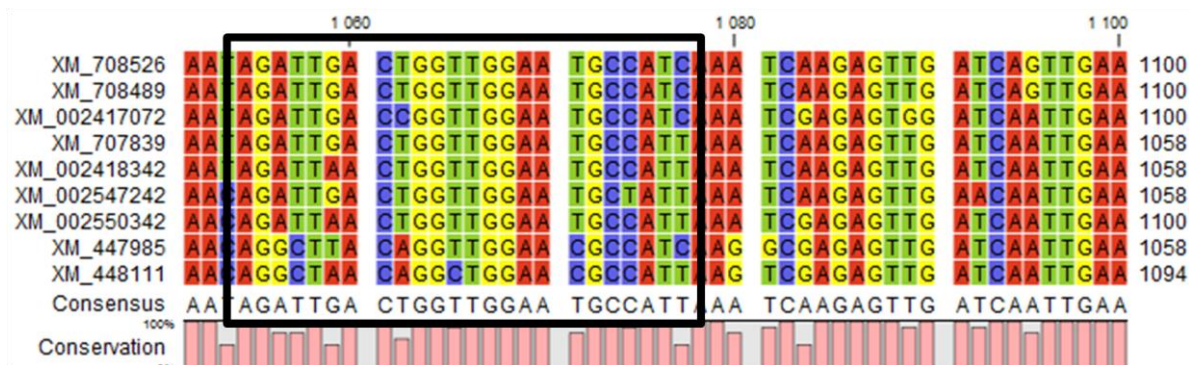
5.1.2.1. Analiza bioinformatyczna sekwencji starterów do wykrywania *Candida* spp.

W oparciu o zakonserwowane sekwencje genu syntazy homocytrynianowej dla gatunków: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* oraz *C. dubliniensis* wybrałem trzy sekwencje starterów (jeden starter *forward* i dwie alternatywne sekwencje startera *reverse*). Miejsca hybrydyzacji starterów przedstawiłem na rycinach nr 16-18.

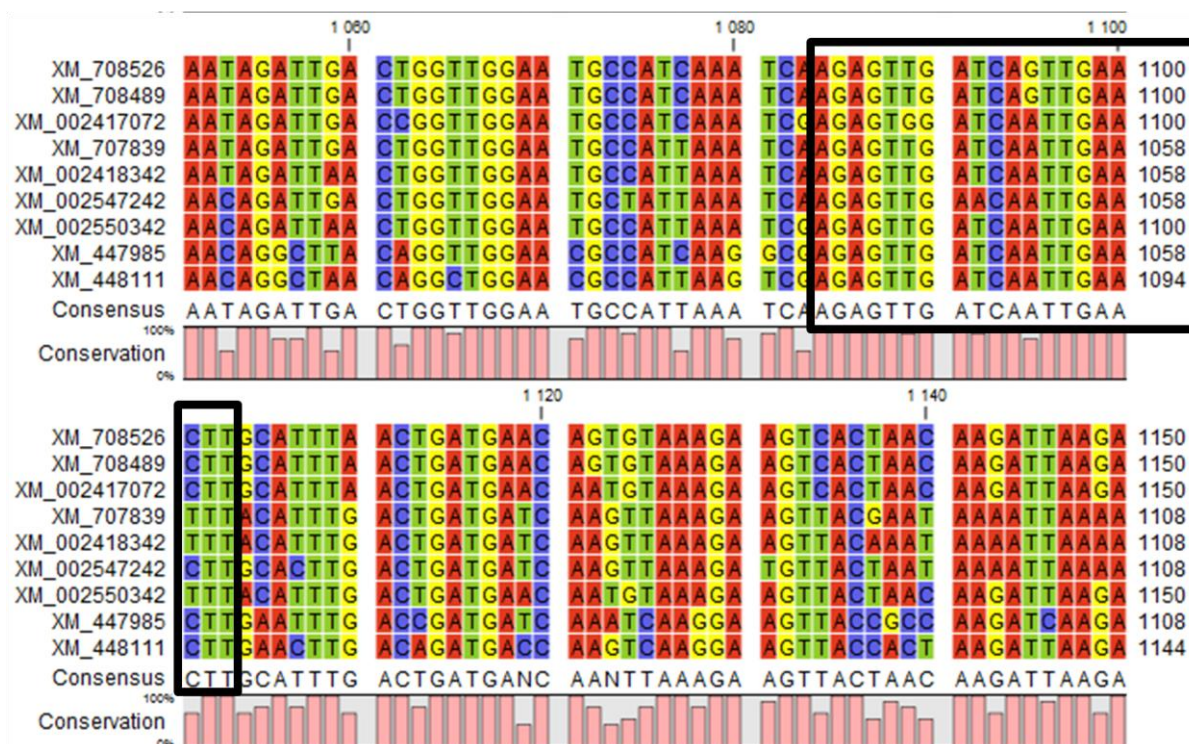
Rycina 16 Miejsce hybrydyzacji startera LysF. Każdy z wierszy odpowiada jednej sekwencji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej pochodzącej z bazy NCBI GenBank dostępnymi pod numerami przedstawionymi z lewej strony.



Rycina 17 Miejsce hybrydyzacji startera LysR1. Każdy z wierszy odpowiada jednej sekwencji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej pochodzącej z bazy NCBI GenBank dostępnymi pod numerami przedstawionymi z lewej strony.



Rycina 18 Miejsce hybrydyzacji startera LysR2. Każdy z wierszy odpowiada jednej sekwencji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej pochodzącej z bazy NCBI GenBank dostępnymi pod numerami przedstawionymi z lewej strony.



Dla zaprojektowanych starterów określiłem ich długość, obliczyłem zawartość % par GC oraz temperaturę topnienia, jak również przeanalizowałem możliwość wystąpienia wzajemnych oddziaływań pomiędzy nimi. Siłę oddziaływania określiłem za pomocą wartości entalpii swobodnej. Różnego rodzaju wytyczne na temat zasad projektowania starterów do reakcji PCR opisują teoretyczne parametry, których spełnienie gwarantuje wysokie prawdopodobieństwo powodzenia reakcji PCR. Przedstawiłem je w tabeli nr 26. Tabela 26 Zalecane parametry starterów oligonukleotydowych do reakcji PCR⁷.

Parametr startera do reakcji PCR	Wartości zalecane
Długość	18-36 nukleotydów
Zawartość par GC	40-60%
Temperatura topnienia	55-65 °C
Sekwencja końca 3'	Unikanie struktur poliC lub poliG (więcej niż 3) Pełna komplementarność

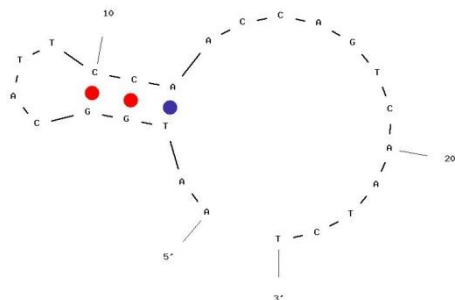
Wyniki przedstawiają tabele nr 27-30.

Tabela 27 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla starterów LysF, LysR1 oraz LysR2.

Starter	Struktura	ΔG [kcal*mol ⁻¹]	T _m [°C]
LysF		0,91	4,7

⁷ opracowanie własne na podstawie:
http://www.genomics.agilent.com/files/Mobio/PCR_Primer_Design_Guidelines.pdf

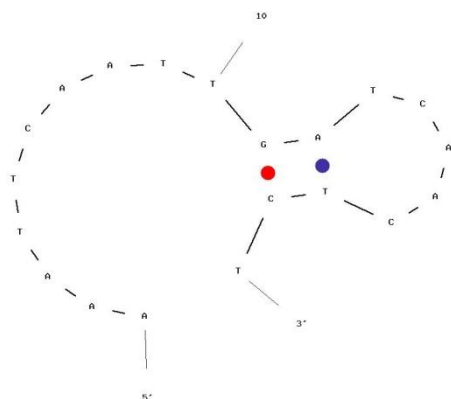
LysR1v



-0,88

38,3

LysR2



0,39

19,6

Tabela 28 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu homodimer dla starterów LysF, LysR1 oraz LysR2.

Starter	Struktura	ΔG [kcal* mol ⁻¹]	Liczba komplementarnych nukleotydów
LysF	<pre> 5' AGAGAAGGTGAACAATTTGC 3' CGTTTAACAAGTGAAGAGA </pre>	-5,36	4
	<pre> 5' AGAGAAGGTGAACAATTTGC ::: 3' CGTTTAACAAGTGAAGAGA </pre>	-3,9	3
	<pre> 5' AGAGAAGGTGAACAATTTGC 3' CGTTTAACAAGTGG </pre>	-3,14	2
LysR1	<pre> 5' AATGGCATTCCAACCAAGTCAAT :::: 3' TCTAACTGACCAACCTTACGGTAA </pre>	-5,37	4

	5' AATGGCATTCCAACCAGTCAATCT :: :::	-5,02	3
	3' TCTAACTGACCAACCTTACGGTAA		
	5' AATGGCATTCCAACCAGTCAATCT : :::	-5,02	3
	3' TCTAACTGACCAACCTTACGGTAA		
	5' AAATTCAATTGATCAACTCT 	-12,42	8
	3' TCTCAACTAGTTAACTTAAA		
LysR2	5' AAATTCAATTGATCAACTCT : :	-12,42	8
	3' TCTCAACTAGTTAACTTAAA		
	5' AAATTCAATTGATCAACTCT 	-5,36	4
	3' TCTCAACTAGTTAACTTAAA		

Tabela 29 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami LysF i LysR1.

Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Liczba komplementarnych nukleotydów
5' AATGGCATTCCAACCAGTCAATCT :: ::: 3' CGTTTAACAAGTGGGAAGAGA	-5,09	3
5' AATGGCATTCCAACCAGTCAATCT : 3' CGTTTAACAAGTGGGAAGAGA	-4,41	3
5' AATGGCATTCCAACCAGTCAATCT :: : :: 3' CGTTTAACAAGTGGAA	-3,90	3

Tabela 30 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami LysF i LysR2.

Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Liczba komplementarnych nukleotydów
<pre> 5' AAATTCAATTGATCAACTCT ::: :: 3' CGTTTAACAAGTGAAGAGA </pre>	-7,32	5
<pre> 5' AAATTCAATTGATCAACTCT : :: 3' CGTTTAACAAGTGAAGAGA </pre>	-7,31	5
<pre> 5' AAATTCAATTGATCAACTCT : :: 3' CGTTTAACAAGTGAAGAGA </pre>	-5,47	4

Wszystkie oligonukleotydy wykazywały specyficzność wobec sekwencji genu syntazy homocytrynianowej przy jednoczesnym braku komplementarności do sekwencji innych fragmentów genomu drożdżaków, innych drobnoustrojów, jak również do sekwencji ludzkiego DNA na podstawie sekwencji dostępnych w bazie NCBI. Analiza występowania struktur typu "szpilka do włosów" nie wykazała oddziaływań o wysokiej energii, a teoretyczna temperatura topnienia takich struktur znajdowała się w zakresie znacząco poniżej temperatur występujących w profilu temperaturowo - czasowym reakcji PCR. W wyniku analizy występowania struktur typu homodimer zakwalifikowałem dwie alternatywne warianty startera *reversed* do badań eksperymentalnych. Dla startera *forward* żadna z wartości ΔG oddziaływań pomiędzy oligonukleotydami nie przekraczała znacząco 5 kcal* mol^{-1} . Ryzyko związane z wyborem tego startera związane było z tym, że możliwe do wystąpienia struktury dwuniciowe, charakteryzowały się wolnym końcem 3', co umożliwia rozpoczęcie reakcji dołączania komplementarnych nukleotydów do wiszącego jednoniciowego końca struktury przez polimerazę DNA. Skutkuje to wydłużeniem starterów i w rezultacie brakiem możliwości hybrydyzacji do specyficznych sekwencji DNA. W przypadku dwóch oddziaływań o największych wartościach bezwzględnej entalpii swobodnej występują niesparowane nukleotydy na końcu 3', co ogranicza możliwość działania polimerazy. W przypadku pierwszego startera *reverse* nie występuje żadne oddziaływanie ze strony wolnego końca 3'. Ponadto, najwyższa bezwzględna wartość ΔG dla tego rodzaju struktur wynosi 5,37 kcal* mol^{-1} . Starter alternatywny LysR2 charakteryzuje się dużo wyższymi wartościami ΔG dla struktur typu selfdimer. Najwyższa wartość wynosi 12,42 kcal* mol^{-1} i występuje dla dwóch struktur,

z czego jedna z nich posiada wolny koniec 3' bez pełnej komplementarności zasad. Teoretyczne analizy oddziaływań pomiędzy parami starterów, również potwierdziły, że preferowany jest pierwszy wariant startera *reverse* ($\Delta G = -5,03 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) w porównaniu z drugą wersją ($\Delta G = -7,32 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$). Niemniej jednak wyższa energia oddziaływań występuje w przypadku struktury, gdzie na końcu 3' nie występuje 100% komplementarność w odróżnieniu od pierwszej pary starterów, gdzie jest pełna zgodność pomiędzy sekwencjami przy wolnym końcu 3' heterodupleksu.

5.1.2.2. Optymalizacja warunków reakcji PCR z wykorzystaniem pary starterów LYSF oraz LYSR1

Po zaprojektowaniu starterów rozpocząłem optymalizację reakcji PCR, w celu uzyskania wydajnej i specyficznej amplifikacji fragmentu genu *lys21*.

Temperatura przyłączania starterów

Na podstawie obliczonej temperatury topnienia starterów (50,9°C dla startera LysF i 57,2°C dla startera LysR1) ustaliłem zakres temperatur, w obrębie których przeprowadziłem optymalizację temperatury przyłączania starterów w reakcji PCR. W celu empirycznego ustalenia wartości tego parametru przeprowadziłem szereg reakcji stosując gradient temperatury w zakresie 56 - 64°C. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia tabela nr 31. Reakcję prowadziłem według profilu temperaturowo-czasowego zgodnie z tabelą nr 32.

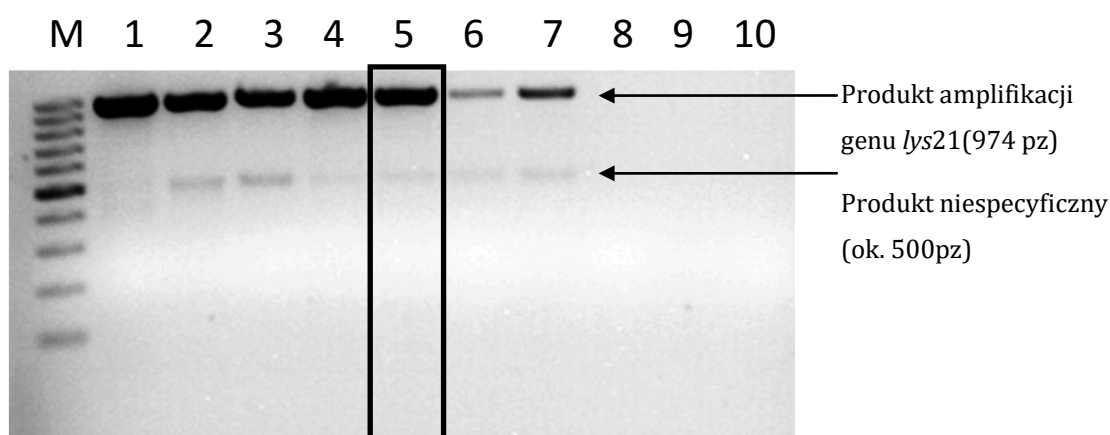
Tabela 31 Skład mieszaniny do reakcji PCR na matrycy genomowego DNA *C. albicans* ATCC90029 z wykorzystaniem starterów LysF i LysR1.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w reakcji PCR
bufor Shark 10x	2,5	1x
dNTPs [8mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25mM]	2,5	2,5 mM
starter LysF [10 μM]	1	0,4 μM
starter LysR1 [10 μM]	1	0,4 μM
polimeraza Pwo [2U/ μl]	0,5	0,04 U/ μl
woda	14	-
DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 [23 ng/ μl]	1	0,92 ng/ μl

Tabela 32 Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR na matrycy genomowego DNA *C. albicans* ATCC90029 z wykorzystaniem starterów LysF i LysR1 - gradient temperatury przyłączania starterów.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
94	120	
94	45	
56-64	30	30
72	60	
72	180	

Wynik reakcji przedstawia rycina nr 19.

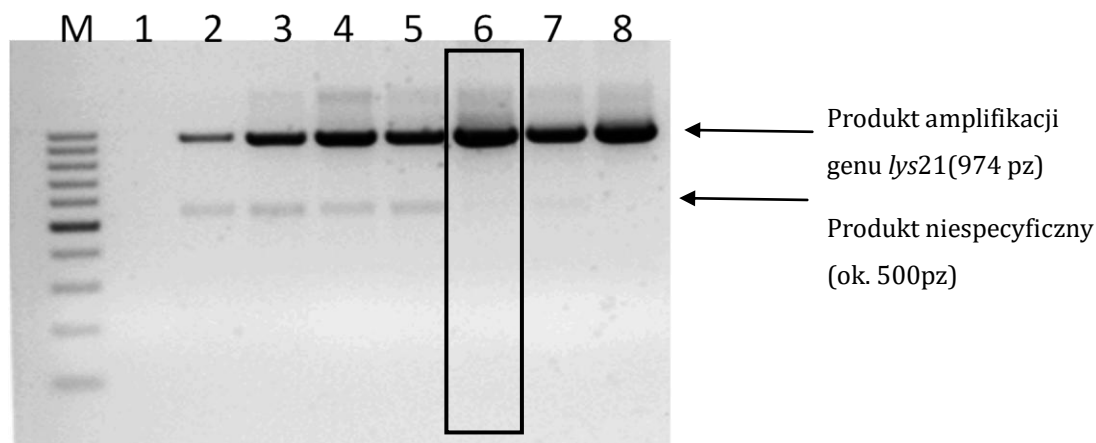


Rycina 19 Obraz rozdziła elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów optymalizacji reakcji PCR z zastosowaniem gradientu temperatury przyłączania starterów LysF i LysR1. M.-marker wielkości DNA 100-1000, 1-56°C, 2-56,7°C, 3-57,5°C, 4-58,5°C, 5-59,6°C, 6-60,8°C, 7-62°C, 8- 63°C, 9-63,9°C, 10. K-

Na podstawie otrzymanego wyniku stwierdziłem pojawienie się niespecyficznego produktu amplifikacji o wielkości ok. 500 pz. Wraz ze wzrostem temperatury przyłączania starterów nie udało się wyeliminować jego powstawania. Jako optymalną wybrałem temperaturę 59,6°C, uznając konieczność optymalizacji składu mieszaniny reakcyjnej.

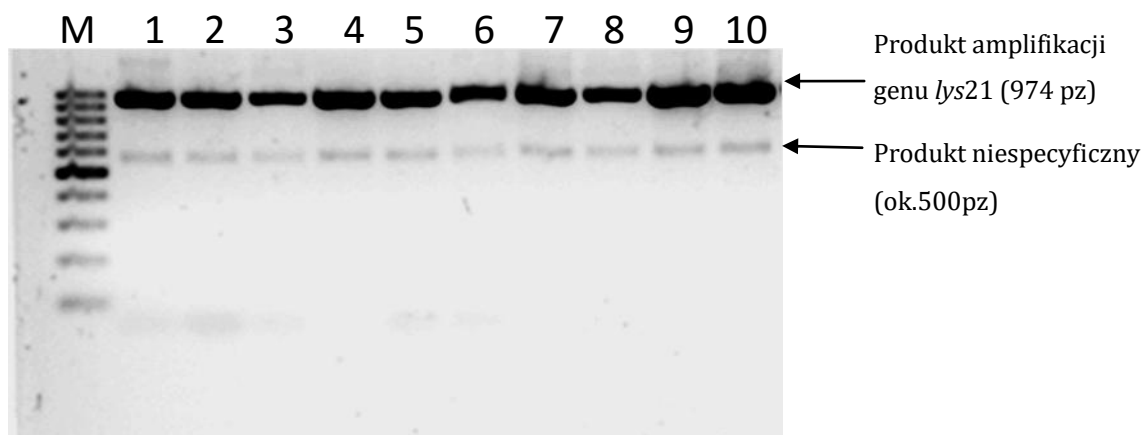
Optymalizacja stężenia jonów magnezu

W celu wyeliminowania powstawania niespecyficznego amplikonu, dla wybranej temperatury przyłączania starterów, przeprowadziłem dalszą optymalizację reakcji PCR pod względem stężenia wolnych jonów magnezu. Skład pozostałych składników mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR zastosowałem jak w tabeli nr 31 i 32. Wynik reakcji przedstawia rycina nr 20.



Rycina 20 Obraz rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów optymalizacji reakcji PCR z zastosowaniem gradientu stężeń jonów magnezu z wykorzystaniem starterów LysF i LysR1. M.-marker wielkości DNA 100-1000, 1-1mM Mg²⁺, 2-1,5mM Mg²⁺, 3-2mM Mg²⁺, 4-2,5mM Mg²⁺, 5-3mM Mg²⁺, 6-3,5mM Mg²⁺, 7-4mM Mg²⁺, 8-4,5mM Mg²⁺.

Na podstawie otrzymanego wyniku wybrałem stężenie jonów magnezu 3,5mM. Przy takim stężeniu otrzymałem wydajną amplifikację, jak również nie pojawiał się niespecyficzny produkt o wielkości ok. 500 pz. W celu potwierdzenia poprawności przyjętych warunków przeprowadziłem reakcję PCR dla 10 różnych klinicznych szczepów *C. albicans* w oparciu o skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo-czasowy jak przedstawiłem w tabelach nr 31 i 32. Wyniki reakcji amplifikacji przedstawiłem na rycinie nr 21.



Rycina 21. Obraz rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów reakcji amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej z wykorzystaniem starterów LysF i LysR1 z zastosowaniem zoptymalizowanych warunków reakcji PCR. M-marker wielkości DNA 100-1000, 1-10- szczepy kliniczne *C. albicans*.

Otrzymany wynik wskazywał na to, iż warunki reakcji PCR zoptymalizowane dotychczas dla jednego szczepu referencyjnego *C. albicans* ATCC90029 nie znajdują potwierdzenia dla klinicznych szczepów tego gatunku.

Zmiana stężenia starterów używanych do reakcji nie wyeliminowała tego problemu, dlatego kolejnym krokiem była zmiana startera.

5.1.2.3. Optymalizacja warunków reakcji PCR z wykorzystaniem pary starterów LYSF oraz LYSR2

Dla nowej pary starterów należało jeszcze raz przeprowadzić optymalizację reakcji amplifikacji.

Optymalizacja temperatury przyłączenia starterów

Optymalizację temperatury przyłączenia starterów przeprowadziłem dla referencyjnego szczepu *C. albicans* ATCC90029 w zakresie 58 - 62°C wg warunków opisanych w tabelach nr 31 i 32. Jako temperaturę optymalną wybrałem 61,9°C. Nie wystąpił problem powstawania niespecyficznych produktów, co pozwalało stwierdzić, że nowa para starterów jest bardziej specyficzna. Dla wybranej temperatury przyłączenia starterów przeprowadziłem reakcję PCR dla różnych gatunków *Candida*. W wyniku tej reakcji otrzymałem produkty jedynie dla *C. albicans* i *C. tropicalis*. Taki wynik pozwolił wysunąć wniosek, iż dla pozostałych gatunków startery charakteryzują się mniejszą specyficznością, co uniemożliwia amplifikację w ustalonych warunkach reakcji. Kolejnym etapem było przeprowadzenie optymalizacji temperatury przyłączenia starterów z uwzględnieniem pięciu klinicznie znaczących gatunków *Candida* jak również dwóch dodatkowych (*C. guilliermondi* i *C. kefyr*) w celu potwierdzenia specyficzności metody względem rodzaju. Reakcje w gradiencie temperatury przyłączenia starterów przeprowadziłem dla każdego gatunku z osobna (*C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*). Skład mieszanin reakcyjnych oraz profil temperaturowo-czasowy reakcji przedstawiają tabele nr 33 i 34.

Tabela 33 Skład mieszaniny do reakcji PCR na z wykorzystaniem starterów LysF i LysR2.

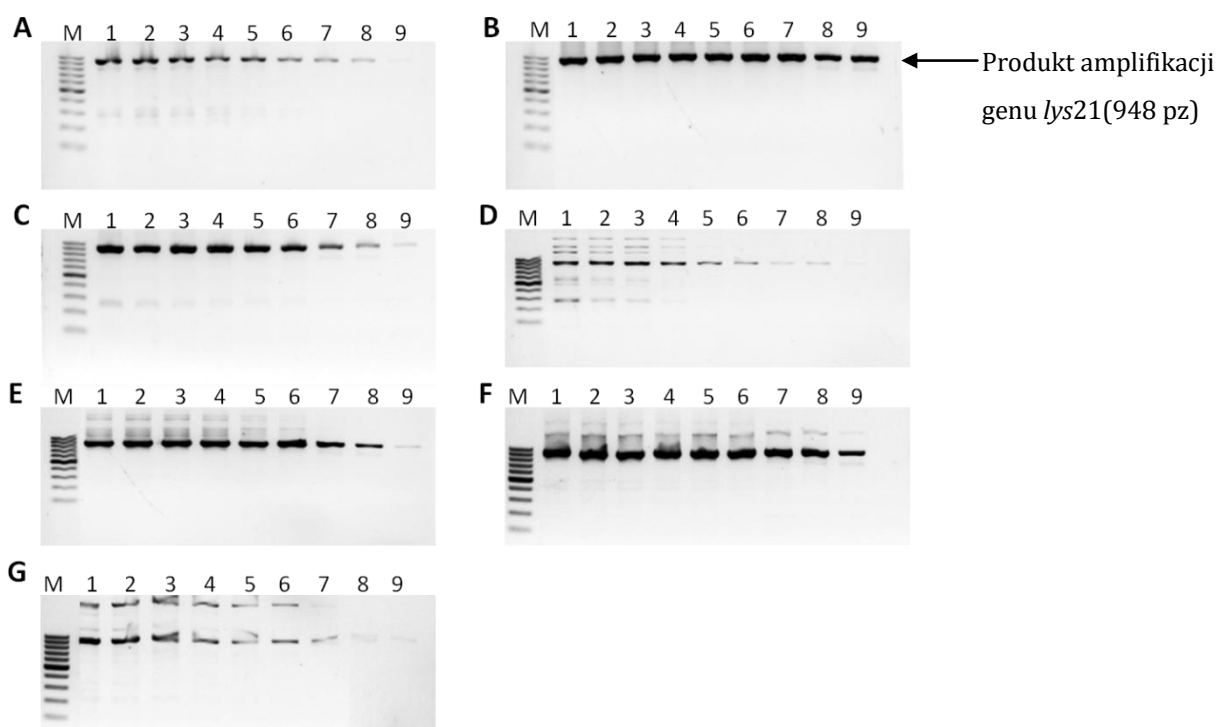
Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w reakcji PCR
bufor Shark 10x	2,5	1x
dNTPs [8mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25mM]	2,5	2,5 mM
starter LysF [10μM]	1	0,4 μM
starter LysR2 [10μM]	1	0,4 μM
polimeraza Pwo [2U/μl]	0,5	0,04 U/μl
woda	14	-
DNA genomowe*	1	-

* *C. guilliermondii* [25ng/μl], *C. albicans* [23 ng/μl], *C. krusei* [31 ng/μl], *C. glabrata* [26 ng/μl], *C. parapsilosis* [24 ng/μl], *C. tropicalis* [19 ng/μl], *C. kefyri* [29 ng/μl]

Tabela 34 Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR z wykorzystaniem starterów LysF i LysR2 - gradient temperatury przyłączania starterów.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
94	120	
94	45	
56-70	30	30
72	60	
72	180	

Wynik eksperymentu przedstawia rycina 22.



Rycina 22 Obraz rozdziła elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów reakcji amplifikacji fragmentu genu *Lys21* z zastosowaniem gradientu temperatury przyłączania starterów: 1-56 °C, 2-57,1 °C, 3-58,4 °C, 4-59,8°C, 5-61,3 °C, 6-62,7 °C, 7-64,1°C, 8-65,6 °C, 9-70,0° C. **M**-marker wielkości DNA 100-1000 **A** - *C. guilliermondii*, **B** - *C. albicans*, **C** - *C. krusei*, **D** - *C. glabrata*, **E** - *C. parapsilosis*, **F** - *C. tropicalis*, **G** - *C. kefyri*.

Otrzymane wyniki nie pozwalają na ustalenie jednej optymalnej temperatury przyłączenia starterów dla wszystkich gatunków *Candida*. W związku z tym postanowiłem zastąpić klasyczną reakcję PCR wariantem *touchdown* PCR.

5.1.2.4. *Touchdown* PCR

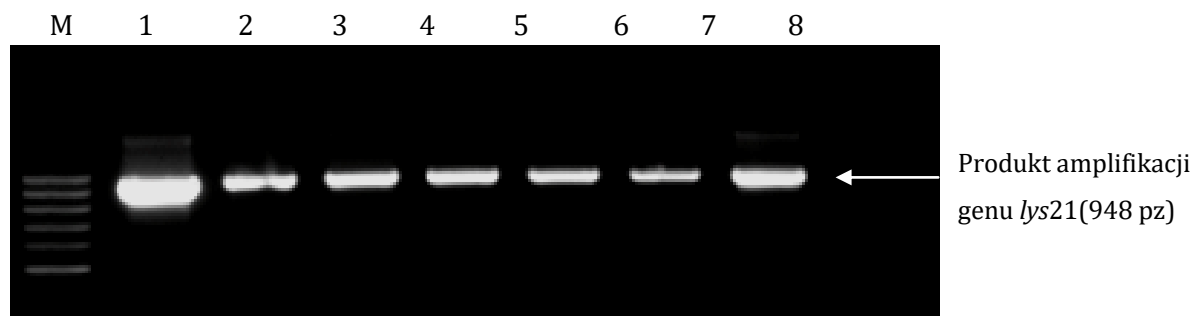
Metoda *touchdown* PCR jest odmianą klasycznej reakcji PCR polegającą na stopniowym obniżaniu temperatury przyłączenia starterów w czasie trwania amplifikacji. Stosuje się ją w celu podniesienia specyficzności reakcji PCR.

Przeprowadziłem reakcje *touchdown* PCR stosując matryce wszystkich badanych gatunków *Candida* w celu doboru optymalnego profilu temperaturowo-czasowego reakcji. Skład mieszaniny reakcyjnej był zgodny z tabelą nr 33. Zoptymalizowany profil temperaturowo-czasowy reakcji *touchdown* PCR przedstawia tabela nr 35.

Tabela 35 Profil temperaturowo-czasowy reakcji *touchdown* PCR.

Temperatura [°C]	Obniżenie temp. w każdym cyklu	Czas	Liczba cykli
94		2 min	
94		45s	
72	-1 stC	30s	3 cykle
72		1 min	
94		45s	
69	-0,5 stC	30s	3 cykle
72		1 min	
94		45s	
67		30s	10 cykli
72		1 min	
94		45s	
67	-0,5 stC	30s	8 cykli
72		1 min	
94		45s	
63		30s	15 cykli
72		1 min	
72		3 min	

Wynik reakcji *touchdown* PCR przedstawia rycina nr 23.



Rycina 23 Obraz rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów reakcji amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej z zastosowaniem *touchdown* PCR. M.-marker wielkości DNA 500-1000, 1-*C. albicans*, 2-*C. krusei*, 3-*C. parapsilosis*, 4-*C. kefyr*, 5-*C. glabrata*, 6-*C. guilliermondii*, 7-*C. tropicalis*, 8.-K-.

Otrzymany obraz żelu wskazuje na wydajną i specyficzną amplifikację fragmentu genu syntazy homocytrynianowej dla 7 gatunków *Candida* wybranych do sprawdzenia specyficzności metody względem rodzaju *Candida*. (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*).

5.1.3. Specyficzna identyfikacja pan-*Candida* w reakcji *real-time* PCR

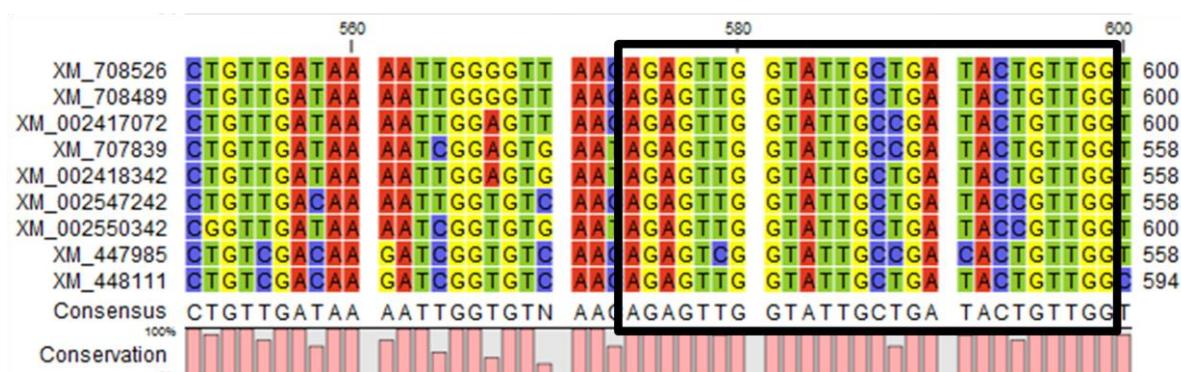
W diagnostyce klinicznej coraz większe zastosowanie znajduje amplifikacja w czasie rzeczywistym tzw. reakcja *real-time* PCR, szczególnie w badaniach wysokowartościowych materiałów (np. krew) oraz w przypadku zagrożenia życia pacjentów. W związku z tym postanowiłem zaprojektować układ do identyfikacji *Candida* spp. w oparciu o gen syntazy homocytrynianowej z wykorzystaniem reakcji *real-time* PCR. Do tego celu wykorzystałem analizy sekwencji genu wykonane dla układu z wykorzystaniem klasycznej reakcji PCR.

Zmieniłem starter *reverse* tak, aby skrócić amplikon, w celu wydajnej amplifikacji w reakcji *real-time* PCR. Polimorfizm sekwencji produktów amplifikacji decyduje o ich różnych temperaturach topnienia. Taką właściwość fizyko-chemiczną postanowiłem wykorzystać do różnicowania (identyfikacji) badanych gatunków *Candida*.

Po zakończeniu etapu amplifikacji, przeprowadza się analizę krzywej topnienia powstałych produktów. Krzywa topnienia jest funkcją wartości fluorescencji F zależną od temperatury. $F=f(T)$ profil topnienia przedstawiany jest w postaci wykresu będącego zależnością pochodnej krzywej topnienia ($-dF/dT$) od temperatury, z maksimum obrazującym T_m danego produktu PCR. Wartość T_m zależy od: stężenia dsDNA, długości i składu nukleotydowego.

5.1.3.1. Analiza bioinformatyczna sekwencji starterów do wykrywania *Candida spp.* za pomocą reakcji *real-time* PCR

W oparciu o dokonane wcześniej analizy sekwencji genu syntazy homocytrynianowej zaprojektowałem starter *reverse* (SynReal) do reakcji *real-time* PCR. Miejsce hybrydyzacji startera przedstawiłem na rycinie nr 24.



Rycina 24 Miejsce hybrydyzacji startera SynReal. Każda z wierszy odpowiada jednej sekwencji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej pochodzącej z bazy NCBI GenBank dostępnymi pod numerami przedstawionymi z lewej strony.

Dla zaprojektowanego startera określiłem długość, obliczyłem zawartość % par GC oraz temperaturę topnienia, jak również przeanalizowałem możliwość wystąpienia wzajemnych oddziaływań pomiędzy starterami w mieszaninie reakcyjnej. Siłę oddziaływania określiłem za pomocą wartości entalpii swobodnej. Wyniki zostały przedstawione w tabelach nr 36-38.

Tabela 36 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla startera SynReal.

Starter	Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Tm [$^{\circ}\text{C}$]
SynReal		-0,86	33,4

Tabela 37 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu homodimer dla startera SynReal.

Starter	Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Liczba komplementarnych nukleotydów
SynReal	<pre> 5' CCAACAGTATCAGCAATACCAACTCT :::: 3' TCTCAACCATAACGACTATGACAACC </pre>	-3,78	4
	<pre> 5' CCAACAGTATCAGCAATACCAACTCT : : : : 3' TCTCAACCATAACGACTATGACAACC </pre>	-3,14	2
	<pre> 5' CCAACAGTATCAGCAATACCAACTCT : :: : 3' TCTCAACCATAACGACTATGACAACC </pre>	-2,94	3

Tabela 38 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami LysF i SynReal.

Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Liczba komplementarnych nukleotydów
<pre> 5' AGAGAAGGTGAACAATTTGC :: :::: 3' TCTCAACTAGTTAACTTAAA </pre>	-7,32	5
<pre> 5' AGAGAAGGTGAACAATTTGC :: : 3' TCTCAACTAGTTAACTTAAA </pre>	-7,31	5
<pre> 5' AGAGAAGGTGAACAATTTG :: : 3' TCTCAACTAGTTAACTTAAA </pre>	-5,47	4

Nowy starter SynReal nie tworzy silnych struktur typu "szpilki do włosów", a także charakteryzuje się niskimi wartościami bezwzględnymi ΔG w przypadku tworzenia homodupleksów (poniżej 4 kcal* mol^{-1}). Ryzykiem jest stosunkowo wysoka wartość tego parametru (7 kcal* mol^{-1}) w przypadku tworzenia heterodupleksów między starterami.



5.1.3.2. Weryfikacja układu opartego o gen *lys21* w klasycznej reakcji PCR

Przeprowadziłem wstępne badania w układach klasycznej reakcji PCR w celu weryfikacji poprawności zaprojektowanych starterów. Pierwszy etap obejmował reakcje z zastosowaniem gradientu temperatury przyłączania starterów z wykorzystaniem szczepu referencyjnego *C. albicans* (ATCC90029). Następnie dla wybranej temperatury przyłączania starterów 62°C przeprowadziłem reakcje z wykorzystaniem szczepów klinicznych. Na rycinie nr 25 przedstawiłem wyniki amplifikacji z zastosowaniem starterów specyficznych wobec genu syntazy homocytrynianowej na matrycy genomowego DNA dla pięciu referencyjnych szczepów *Candida*: *C. albicans* (ATCC90029), *C. parapsilosis* (ATCC22019), *C. krusei* (ATCC6258), *C. tropicalis* (ATCC750), *C. glabrata* (ATCC2001). Opracowany skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil reakcji przedstawiłem odpowiednio w tabelach 39 i 40.

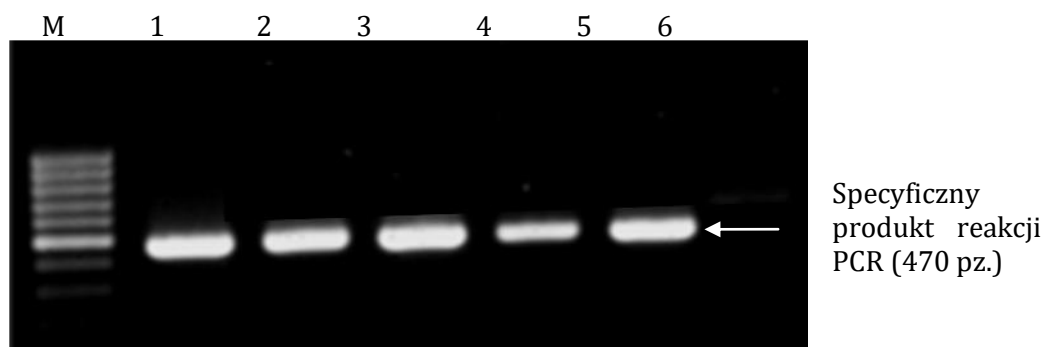
Tabela 39 Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej z wykorzystaniem starterów LysF oraz SynReal.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
bufor TaqNova KCl 10x	2,5	1x
dNTPs [8mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25mM]	2,5	2,5 mM
starter LysF [10μM]	1	0,4 μM
starter SynReal [10μM]	1	0,4 μM
polimeraza TaqNova [2U/μl]	0,5	0,04 U/μl
woda	14	-
matrycowe DNA*	1	-

* *C. albicans* [23 ng/μl], *C. krusei* [31 ng/μl], *C. glabrata* [26 ng/μl], *C. parapsilosis* [24 ng/μl], *C. tropicalis* [19 ng/μl]

Tabela 40 Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR z wykorzystaniem starterów LysF oraz SynReal.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
94	180	
94	30	
62	30	30
72	30	
72	180	



Rycina 25 Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów PCR z zastosowaniem starterów LysF oraz SynReal. M- marker wielkości 100-1000, 1 -5 - referencyjne szczepy *Candida*: odpowiednio *Candida albicans* ATCC90029, *Candida glabrata* ATCC2001, *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Candida tropicalis* ATCC750, *Candida krusei* ATCC6258, 6 - kontrola ujemna reakcji PCR.

Otrzymane wyniki potwierdzają poprawność zaprojektowanych starterów. Otrzymałem pożądane amplikony o wielkości 470 pz. dla wszystkich pięciu klinicznie istotnych gatunków z rodzaju *Candida*.

Kolejnym krokiem było zaadoptowanie opracowanego układu do reakcji *real-time* PCR. Zoptymalizowany skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil reakcji zostały przedstawione w tabelach 41 i 42.

Tabela 41 Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej za pomocą *real-time* PCR.

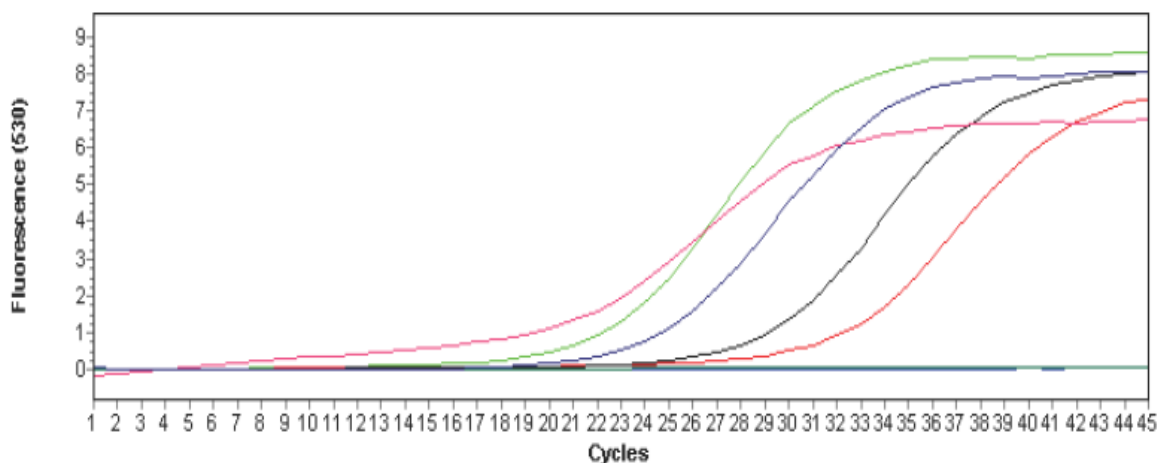
Odczynnik	Objętość [μ l]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	12	-
MgCl ₂ [25mM]	2	2,5 mM
LYSF [10 μ M]	1	0,5 μ M
LYSReal [10 μ M]	1	0,5 μ M
Master SYBR Green	2	1x
matrycowe DNA*	2	-

* *C. albicans* [2,3 ng/ μ l], *C. krusei* [3,1 ng/ μ l], *C. glabrata* [2,6 ng/ μ l], *C. parapsilosis* [2,4 ng/ μ l], *C. tropicalis* [1,9 ng/ μ l]

Tabela 42 Profil temperaturowo-czasowy reakcji *real-time* PCR do amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej

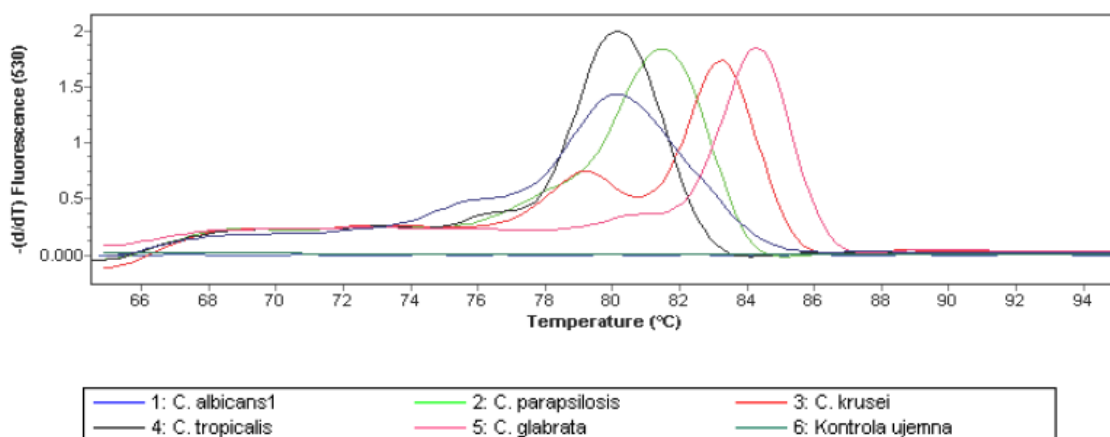
Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas [s]	Cykle
95	600	
95	10	
62	20	45
72	10	

Wyniki amplifikacji fragmentu genu *lys21* w układzie *real-time* PCR przedstawiłem na rycinie nr 26.



Rycina 26 Wynik amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej dla pięciu klinicznie istotnych gatunków *Candida* z wykorzystaniem reakcji *real-time* PCR.

W przypadku amplifikacji DNA wszystkich badanych gatunków *Candida* wydajność reakcji kształtowała się na podobnym poziomie. Wartości Ct dla przeprowadzonej reakcji znajdowały się w zakresie od 23 do 34 cykli. Przesunięcia w wartościach Ct związane są ze stężeniem wyjściowym matrycy DNA w mieszaninie reakcyjnej, jednak biorąc pod uwagę fakt, że wszystkie stężenia DNA były tego samego rzędu wielkości, a zmiany wartości Ct były znaczące (nawet o 10 cykli) można stwierdzić, iż kinetyka reakcji jest zależna od gatunku. Może to być związane z różnicami w sekwencji w obrębie amplikonu, jak również brakiem 100% komplementarności starterów dla *C. krusei* (wartość Ct była najwyższa dla tego gatunku). Na etapie projektowania starterów sekwencja genu syntazy homocytrynianowej dla *C. krusei* nie była znana (brak zdeponowanej sekwencji w bazie danych NCBI), stąd nie była możliwa wcześniejsza weryfikacja zaprojektowanych starterów. Przebieg krzywej amplifikacji dla *C. glabrata* wskazuje na niższą wydajność amplifikacji w porównaniu z innymi gatunkami, o czym świadczy niższy poziom fluorescencji końcowej oraz mniejsze nachylenie krzywej amplifikacji. Wy tłumaczeniem obniżonej wydajności amplifikacji dla tej matrycy może być zbyt wysokie stężenie DNA w reakcji w porównaniu do innych matryc, co spowodowało inhibicję amplifikacji. W celu oceny specyficzności reakcji oraz polimorfizmu sekwencji w obrębie amplifikowanego fragmentu przeprowadziłem analizę profili topnienia produktów (rycina nr 27).



Rycina 27. Krzywe topnienia produktów reakcji *real-time* PCR z wykorzystaniem genu syntazy homocytrynianowej dla *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*.

Na podstawie krzywych topnienia produktów reakcji można stwierdzić, że dla wszystkich gatunków otrzymano specyficzny produkt amplifikacji. Jedynie dla *C. krusei* można zaobserwować dwa piki w przebiegu krzywej topnienia co może świadczyć o powstawaniu dwóch produktów w reakcji. W związku z tym, że produkt niespecyficzny powstaje ze znacznie mniejszą wydajnością nie wpływa to na wynik diagnostyczny. Temperatury topnienia ampliconów są identyczne dla *C. albicans* i *C. tropicalis* co jest zgodne z bliskim pokrewieństwem genetycznym tych dwóch gatunków. Dla pozostałych gatunków występowały różnice w temperaturach topnienia produktów (tabela nr 43)

Tabela 43 Temperatury topnienia ampliconów w reakcji pan-*Candida real-time* PCR

Gatunek	Temperatura topnienia produktu reakcji PCR [°C]
<i>C. albicans</i>	80,2
<i>C. tropicalis</i>	80,2
<i>C. glabrata</i>	84,7
<i>C. parapsilosis</i>	81,8
<i>C. krusei</i>	83,5

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, iż wybrany fragment genu syntazy homocytrynianowej jest dobrym celem molekularnym do diagnostyki zakażeń wywołanych przez *Candida* spp. i może być stosowany w preferowanej w laboratorium klinicznym technice *real-time* PCR, (ze względu na zamknięty system i tym samym obniżone ryzyko kontaminacji). Zaprojektowany układ umożliwi wykrywanie wszystkich pięciu klinicznie istotnych gatunków *Candida*. Możliwość przypisania do poziomu gatunku jest jednak ograniczona do trzech gatunków: *C. glabrata*, *C. parapsilosis* oraz *C. krusei*. Pozostałe dwa gatunki: *C. tropicalis* i *C. albicans* charakteryzują się taką samą temperaturą topnienia ampliconu otrzymywanego w reakcji PCR (80,2 °C). Identyfikacja gatunkowa

możliwa do uzyskania w opracowanym układzie niesie jednak za sobą istotną informację z punktu widzenia wdrożenia właściwego leczenia, gdyż *C. glabrata* oraz *C. krusei* wykazują oporność na flukonazol.

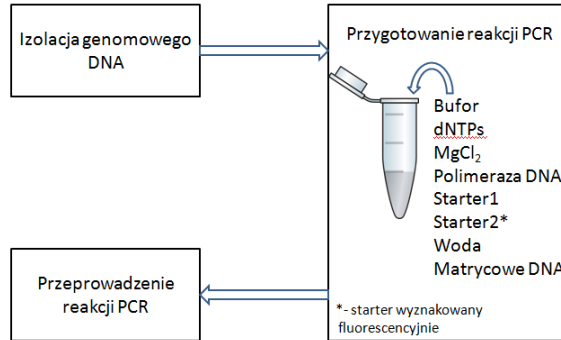
5.1.4. Metoda t-RFLP do identyfikacji gatunkowej sześciu klinicznie znaczących gatunków z rodzaju *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*)

Metoda t-RFLP polega na zastosowaniu wyznakowanego fluorescencyjnie na końcu 5' startera oligonukleotydowego do reakcji PCR. W wyniku amplifikacji uzyskuje się produkty o jednakowej długości dla wszystkich wykrywanych gatunków. Następnie amplikony poddaje się trawieniu odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi. Produkty trawienia rozdziela się za pomocą elektroforezy (agarozowej, poliakrylamidowej lub kapilarnej). Wizualizację żeli agarozowych i poliakrylamidowych przeprowadza się w świetle UV jednak bez stosowania jakichkolwiek barwników ponieważ produkt PCR wykazuje fluorescencję z powodu obecności fluoroforu obecnego w wyznakowanym starterze do reakcji PCR. Uzyskiwany sygnał pochodzi od jednego z fragmentów restrykcyjnych, który zawiera wyznakowany koniec pochodzący od wbudowanego startera oligonukleotydowego. Wykorzystanie elektroforezy kapilarnej pozwala na wykrycie minimalnych różnic w długości uzyskanych fragmentów restrykcyjnych. Zastosowanie metody t-RFLP upraszcza proces przypisywania uzyskiwanych wzorów restrykcyjnych do poszczególnych gatunków, ponieważ widoczny jest jedynie pojedynczy specyficzny sygnał. Metoda ta znalazła zastosowanie w różnego rodzaju badaniach epidemiologicznych (Horz 2012) (Watanarajanaporn 2013) (Bokulich 2012) (Li 2007), w genotypowaniu drobnoustrojów i badaniu zmienności środowisk, w których występują takich jak kompostowniki (Tiquia 2010), gleby (Osborn 2000) czy osady czynne (Eschenhagen 2003). Dotychczas metoda ta nie została wykorzystana do identyfikacji gatunkowej klinicznie znaczących drobnoustrojów. Tego rodzaju potencjał metody t-RFLP został jednak wykazany w przypadku identyfikacji gatunków zwierząt i był wykorzystany do opracowania układu do określania gatunku mięsa (Wang 2010).

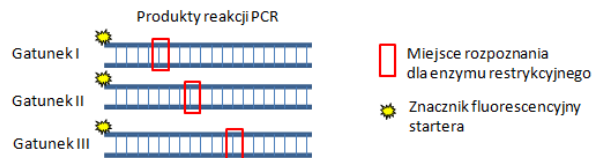
W związku z wyraźnie zauważalnym polimorfizmem w obrębie fragmentu genu syntazy homocytrynianowej, który stał się celem molekularnym do identyfikacji drożdżaków z rodzaju *Candida* za pomocą reakcji *real-time* PCR postanowiłem zaprojektować układ do identyfikacji gatunkowej sześciu klinicznie znaczących gatunków *Candida* w oparciu o metodę analizy polimorfizmu terminalnych fragmentów

restrykcyjnych tzw. t-RFLP (*terminal Restriction Fragments Length Polymorphism*). Schemat zaprojektowanej metody przedstawia rycina nr 28.

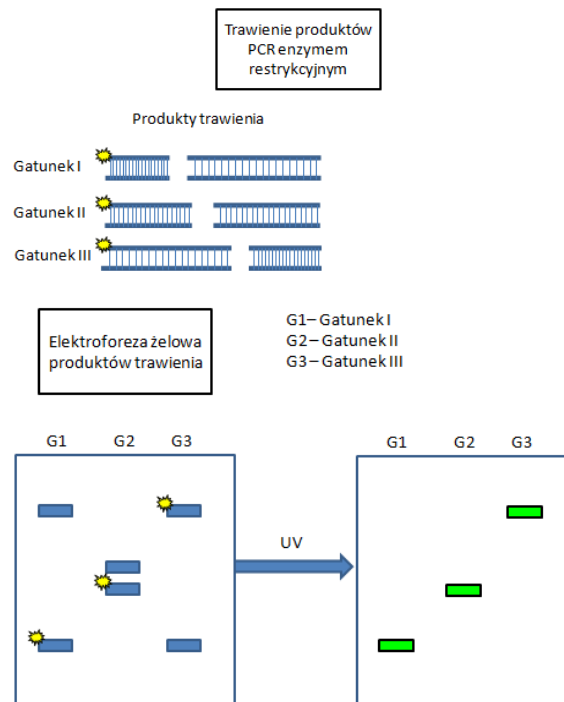
1



2



3

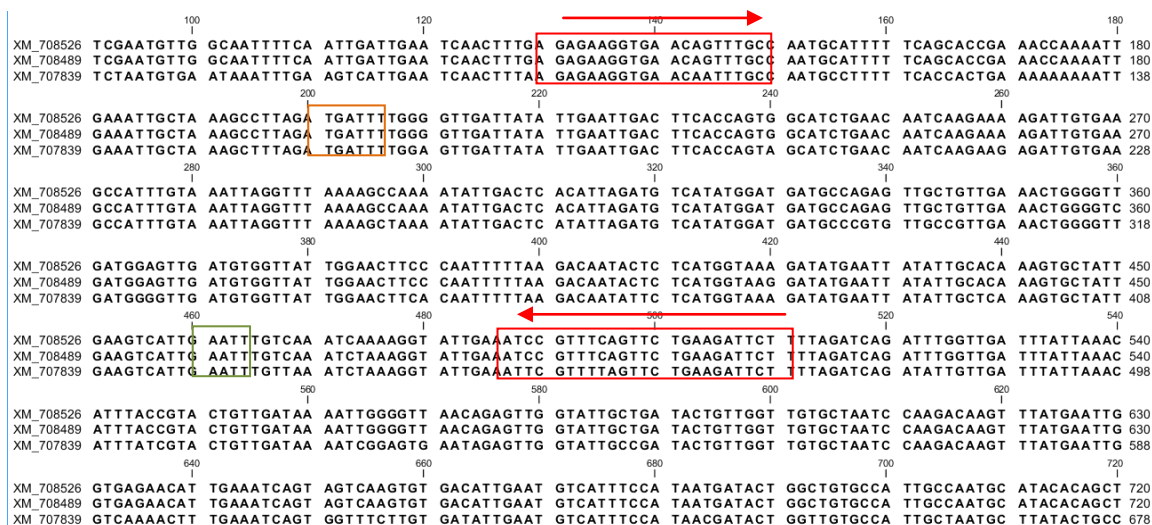


Rycina 28 Schemat metody t-RFLP 1-etap przygotowania reakcji PCR, 2-etap amplifikacji i trawienia, 3-etap rozdzielenia i wizualizacji produktów trawienia.

5.1.4.1. Analiza bioinformatyczna sekwencji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej w celu zastosowania do metody t-RFLP

Sekwencje amplifikowanego fragmentu genu syntazy homocytrynianowej dla sześciu referencyjnych gatunków *Candida* (*C. albicans* ATCC 90029, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. dubliniensis* CD36) zostały przeanalizowane w celu doboru zestawu enzymów restrykcyjnych umożliwiających jednoznaczną identyfikację gatunkową na podstawie analizy długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych. Celem analizy było takie zaprojektowanie metody, aby przy najmniejszej liczbie enzymów restrykcyjnych zapewnić identyfikację wszystkich sześciu wymienionych wyżej gatunków. Analiza sekwencji miała na celu znalezienie kombinacji enzymów restrykcyjnych, dla których otrzymywany profil restrykcyjny fragmentów terminalnych byłby unikalny dla każdego z wykrywanych gatunków. W wyniku analizy wybrałem zestaw trzech enzymów restrykcyjnych: *Bgl*III, *Dra*I i *Rsa*I. Na rycinach nr 29-34 przedstawiłem sekwencje amplifikowanych fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dla poszczególnych gatunków *Candida* wraz z zaznaczeniem miejsc rozpoznania dla wybranych specyficznych endonukleaz. Z powodu braku opublikowanych sekwencji dla genu syntazy homocytrynianowej *C. krusei*, niezbędne było zsekwencjonowanie produktu PCR dla tego gatunku drożdżaka. W wyniku analizy bioinformatycznej otrzymanych wyników sekwencjonowania zdeponowałem dwie sekwencje genu syntazy homocytrynianowej w bazie NCBI GenBank pod numerami: KT_362370 oraz KT_362371.

C. albicans ATCC 90029



Rycina 29 Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI dla *C. albicans* ATCC 90029. Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu *RsaI*, natomiast na pomarańczowo miejsce rozpoznania dla enzymu *DraI*.

C. tropicalis ATCC 750



Rycina 30 Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI dla *C. tropicalis* ATCC 750. Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu *RsaI*, na pomarańczowo miejsce rozpoznania dla enzymu *DraI*, natomiast na niebiesko dla enzymu *BglII*.

C. glabrata ATCC 2001

```

      100      120      140      160      180
XM_447985  GTTAACAGCT TTCAATTAAT TGACTCGACG CTGAGAGAAG GTGAGCAATT TGCTAATGCG TTTTITGATA CCGAAAAGAA GATAGAGATT 144
XM_448111  GTCAAGGAAT TTCAACTGAT TGACTCTACC TTGAGAGAAG GTGAGCAATT TGCCAATGCT TTCTTCGACA CTGAGAAGAA GATTGAAATT 180
      200      220      240      260      280
XM_447985  GCAAAGGCTC TGGATGACTT TGGTGTGCGA TATATTGAGC TGACATCCCC AGTTGCTTCT GAACAGTCTT ACAAAGATTG TAAGGCAATC 234
XM_448111  GCCAAGGCCT TGGATGACTT CCGTGTGCGA TACATTGAAT TGACCTCTCC AGTGGCCTCT GAGCAGTCTT TCAGAGATTG TAAGGCTATT 270
      300      320      340      360
XM_447985  TGTAATCTAG GGTGAAGGC AAAAATTCTG ACCCACATTC GTTGCCACAT GGACGATGCC AAAGTGGCCG TTGAGACTGG TGTTGATGGT 324
XM_448111  TGCAACCTGG GATTAAGGC AAAGATTCTT ACCCACATTC GTTGCCACAT GGACGATGCC AAAGTGGCCG TTGAGACTGG TGTCGATGGT 360
      380      400      420      440      460
XM_447985  GTTGATGTTG TCATCGGTAC ATCCAAGTTT TTAAGGCAAT ACTCTCATGG TAAGGACATG AACTATATTG CCAAGAGTGC CATTGAGGTT 414
XM_448111  GTTGATGTTG TCATCGGTAC TTCCAAGTTT TTGAGACAGT ACTCCCACGG TAAGGACATG AATTATATTG CCAAGAGTGC CATTGAGGTT 450
      480      500      520      540
XM_447985  ATCGAATTTG TTAATCCAA AGGCATTGAG ATCAGATTTT CTTCTGAAGA TAGTTTCAGA AGTGACCTGG TCGATCTGCT GAATATTTAC 504
XM_448111  ATCGAGTTCC TTAAGTCAA GGGTATTGAG ATCAGATTTT CCTCCGAAGA TAGTTTCAGA AGTGACCTGG TTGATCTACT GAATATTTAT 540
      560      580      600      620      640
XM_447985  AAGACTGTCG ACAAGATCGG TGTCAACA GA GTCGGTATTG CCGACACTGT TGGTTGCCGC AACCTAGAC AAGTTTACGA ATTGTAAGG 594
XM_448111  AAGACTGTCG ACAAGATCGG TGTCAACA GA GTTGGTATTG CTGACTACTGT TGGTGTGCT AACCCAAGAC AAGTTTACGA GTTGGTCAGA 630

```

Rycina 31 Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI dla *C. glabrata* ATCC 2001. Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu *RsaI*.

C. dubliniensis CD36

```

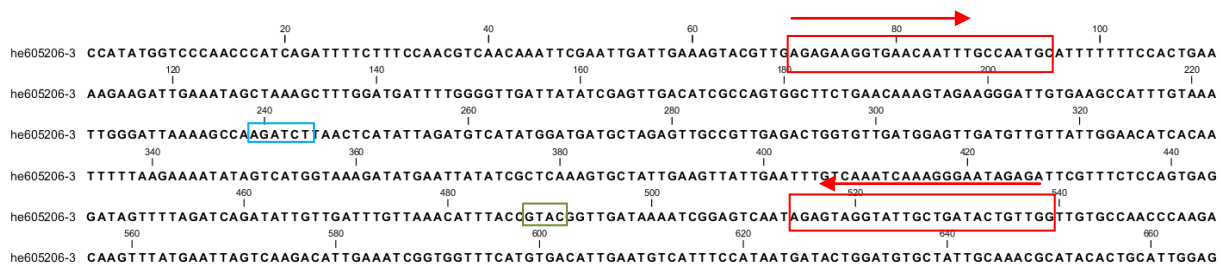
      100      120      140      160      180
XM_002418342 TCCAATGTCA ATAAATTTGA AGTCATTGAA TCAACTTTAA GAGAAGGTGA ACAATTTGCT AATGCCTTTT TCACTACTGA AAAAAAATT 138
XM_002417072 TCCAATGTTG GTAATTTCCA ATTGATTGAA TCAACTTTAA GAGAAGGTGA ACAATTTGCT AATGCCTTTT TCTCTACTGA AACCAAAATT 180
      200      220      240      260      280
XM_002418342 GAAATTGCTA AAGCTTTAGA TGATTTTGGG GTTGATTATA TTGAATTGAC TTCACCAGTA GCATCAGAAC AATCAAGAAA AGATTGTGAA 228
XM_002417072 GAAATTGCCA AAGCCTTAGA TGATTTTGGT GTTGATTATA TTGAATTGAC TTCTCCAGTG GCATCAGAAC AATCCAGAAA AGATTGTGAA 270
      300      320      340      360
XM_002418342 GCCATTTGTA AATTAGTTTT AAAAGCTAAA ATATTAAC TC ATATTAGATG TCATATGGAT GATGCTAGAG TTGCTGTTGA AACTGGAGTT 318
XM_002417072 GCCATTTGTA AATTAGTTTT AAAAGCTAAA ATATTGACTC ACATTAGATG TCATATGGAT GATGCTAGAG TTGCCGTTGA AACTGGGTT 360
      380      400      420      440      460
XM_002418342 GATGGAGTTG ATGTAGTTAT TGGAACCTCT CAATTTTTAA GACAATATTC TCATGGTAAA GATATGAATT ATATTGCTCA AAGTGCTATT 408
XM_002417072 GATGGGTTG ATGTGGTTAT TGGAACCTCC CAATTTTTAA GACAATATTC TCATGGTAAA GATATGAATT ATATTGCTCA AAGTGCTATT 450
      480      500      520      540
XM_002418342 GAAGTTATTG AATTGTTAA ATCTAAAGGT ATTGAAATTC GTTTTAGTTC TGAAGATTCA TTAGATCAG ATATTGTTGA TTTATTAAT 498
XM_002417072 GAAGTTATTG AATTGTTAA ATCTAAAGGT ATTGAAATTC GTTTCAGTTC AGAAGATTCC TTAGATCTG ATTTGGTTGA TTTATTAAC 540
      560      580      600      620      640
XM_002418342 ATTTATGTA CTGTTGATAA AATTGGAGTG AATAGAGTTG GTATTGCTGA TACTGTTGTT TGTGCTAATC CAAGACAAGT TTATGAATTG 588
XM_002417072 ATCTATGTA CTGTTGATAA AATTGGAGTT AATAGAGTTG GTATTGCCGA TACTGTTGTT TGTGCTAATC CAAGACAAGT TTATGAATTG 630

```

Rycina 32 Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI *C. dubliniensis* CD36. Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu *RsaI*, na pomarańczowo miejsce rozpoznania dla enzymu *DraI*, natomiast na niebiesko dla enzymu *BglII*.

C. parapsilosis ATCC 22019

A



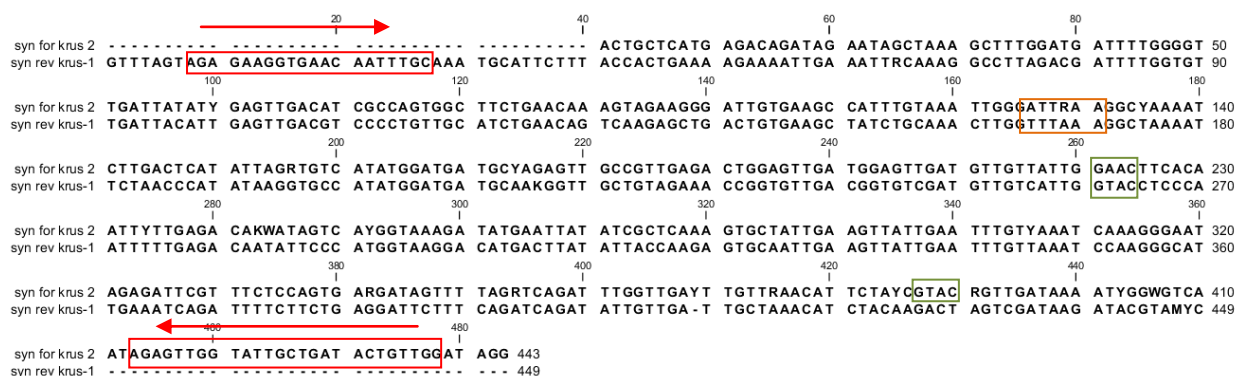
B



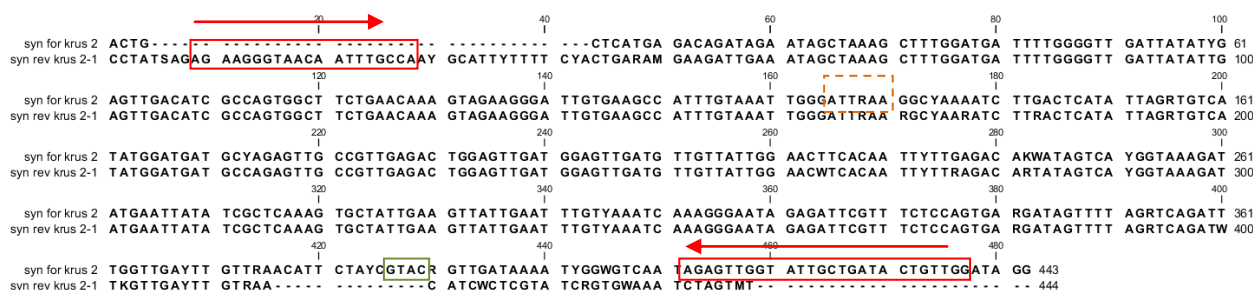
Rycina 33 Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI *C. parapsilosis* ATCC 22019. Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu *RsaI*, na niebiesko dla enzymu *BglII*.

C. krusei

A



B



Rycina 34 Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI dla *C. krusei*. Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu *RsaI*, na pomarańczowo miejsce rozpoznania dla enzymu *DraI*.

Na podstawie analizy sekwencji sporządziłem teoretyczne profile restrykcyjne dla wszystkich gatunków z wykorzystaniem trzech enzymów restrykcyjnych: *BglII*, *RsaI* oraz *DraI*. Wynik przedstawiłem w tabeli nr 44.

Tabela 44 Teoretyczne wielkości produktów po trawieniu ampikonów w metodzie t-RFLP, liczby wyrażają długość fragmentów restrykcyjnych [pz].

*fragmenty zawierające starter wyznakowany fluorescencyjnie.

Gatunek	Enzym restrykcyjny		
	<i>BglII</i> [pz.]	<i>RsaI</i> [pz.]	<i>DraI</i> [pz.]
<i>C. albicans</i>	470*	420*/50	161*/309
<i>C. dubliniensis</i>	470*	420*/50	161*/309
	385*/85		
<i>C. tropicalis</i>	470*	255*/164/51	161/309
	385*/85		
<i>C. glabrata</i>	470*	255*/193/22	470*
<i>C. parapsilosis</i>	470*	420*/50	470*
	171*/299		
<i>C. krusei</i>	470*	255*/164/51	161*/309

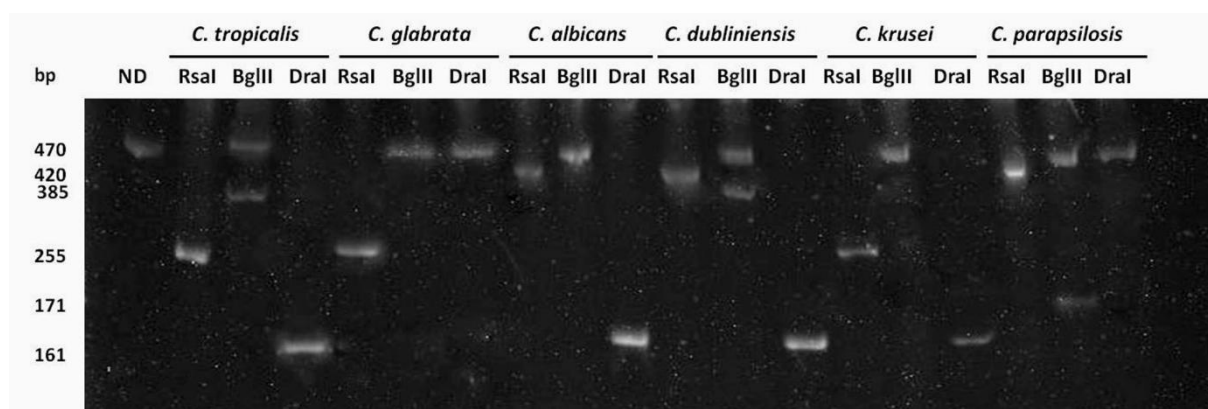
Pomimo tego, że wykorzystałem te same startery do reakcji PCR jak w przypadku identyfikacji pan-*Candida* konieczne było zoptymalizowanie składu mieszaniny reakcyjnej oraz profilu temperaturowo-czasowego amplifikacji, ponieważ modyfikacja startera na końcu 5' poprzez dodanie fluoresceiny jako barwnika fluorescencyjnego zmieniła charakterystykę układu. Zoptymalizowane warunki reakcji przedstawiłem w tabelach 45 i 46. Produkty amplifikacji poddałem trawieniu wybranymi endonukleazami restrykcyjnymi. Do weryfikacji poprawności zaprojektowanej metody wykorzystałem szczepy referencyjne: ATCC90029 (*C. albicans*), ATCC2019 (*C. parapsilosis*), ATCC6258 (*C. krusei*), ATCC750 (*C. tropicalis*), ATCC2001 (*C. glabrata*), MYA-646 (*C. dubliniensis*). Rycina nr 35 przedstawia wynik elektroforezy poliakrylamidowej produktów trawienia. Tabela 45 Skład mieszaniny reakcyjnej dla układu diagnostycznego opartego o metodę t-RFLP.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w reakcji PCR
bufor Shark 10x	2,5	1x
dNTPs [8mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25mM]	2,5	2,5 mM
starter LysFluo[10μM]	1	0,4 μM
starter SynReal [10μM]	1	0,4 μM
polimeraza Pwo [2U/μl]	1	0,08 U/μl
woda	14	-
DNA genomowe*	1	-

* *C. albicans* [23 ng/μl], *C. krusei* [31 ng/μl], *C. glabrata* [26 ng/μl], *C. parapsilosis* [24 ng/μl], *C. tropicalis* [19 ng/μl], *C. dubliniensis* [25 ng/μl]

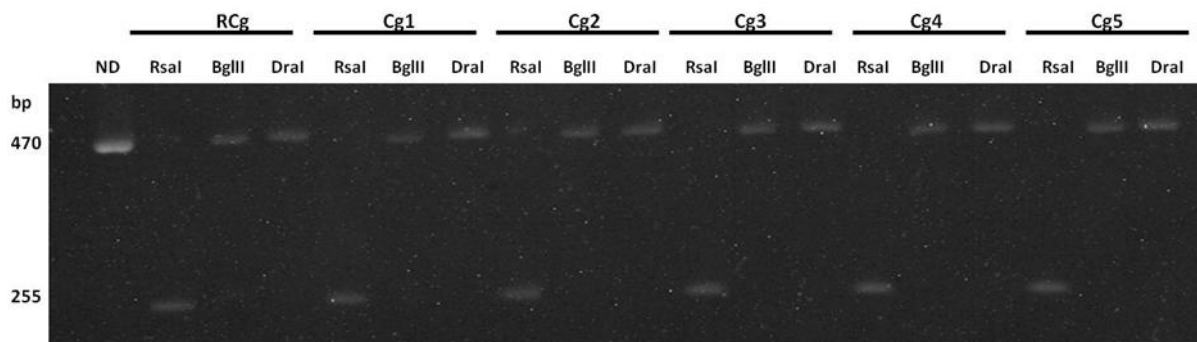
Tabela 46 Profil temperaturowo-czasowy reakcji dla układu diagnostycznego opartego o metodę t-RFLP.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
94	120	
94	30	
55	30	40
72	30	
72	180	



Rycina 35 Wynik rozdziału elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym produktów trawienia fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dla referencyjnych szczepów *Candida*, ND-nietrawiony produkt amplifikacji.

Uzyskałem wyniki zgodne ze spodziewanymi na podstawie analizy sekwencji. Przeprowadziłem również identyfikację szczepów klinicznych uzyskując wyniki zgodne z założonymi. Przykładowy wynik identyfikacji przedstawia rycina nr 36.



Rycina 36 Wynik rozdziału elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym produktów trawienia fragmentów genu syntazy homocytrynianowej, dla szczepu referencyjnego *C. glabrata* ATCC 2001 i klinicznych szczepów *C. glabrata* (Cg1-Cg5) ND-nietrawiony produkt amplifikacji.

Otrzymane wyniki wskazują na to, że gen syntazy homocytrynianowej jest dobrym celem molekularnym zarówno do rodzajowej jak i specyficznej gatunkowo identyfikacji drożdżaków *Candida*. Polimorfizm w obrębie amplifikowanych fragmentów genu umożliwia identyfikację trzech gatunków *C. glabrata*, *C. krusei* i *C. parapsilosis* na podstawie temperatury topnienia produktów reakcji *real-time* PCR. Zastosowanie metody t-RFLP z wykorzystaniem trzech enzymów restrykcyjnych pozwoliło na zwiększenie potencjału różnicowania gatunkowego do sześciu klinicznie istotnych gatunków (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* i *C. dubliniensis*). Wykazałem również, że polimorfizm w obrębie genu syntazy homocytrynianowej oprócz tego, że jest gatunkowo specyficzny to wykazuje stałość sekwencji w obrębie jednego gatunku, co umożliwia identyfikację niespokrewnionych szczepów klinicznych. Podnosi to tym samym potencjał aplikacyjny opracowanych układów diagnostycznych.

5.1.5. Specyficzność i czułość układów diagnostycznych opartych o gen syntazy homocytrynianowej

Zoptymalizowane układy diagnostyczne wykorzystujące jako cel molekularny gen syntazy homocytrynianowej sprawdziłem pod kątem specyficzności. Układ diagnostyczny t-RFLP nie został przetestowany, gdyż wykorzystuje te same sekwencje starterów, jak układ oparty o reakcję *real-time* PCR. Wyniki przedstawia tabela nr 47.

Tabela 47 Specyficzność reakcji PCR oraz *real-time* PCR do identyfikacji pan-*Candida*.

Gatunek	Wynik reakcji pan- <i>Candida</i> [PCR/ <i>real-time</i> PCR]
<i>C. albicans</i>	+/+
<i>C. glabrata</i>	+/+
<i>C. krusei</i>	+/+
<i>C. kefyr</i>	+/+
<i>C. guilliermondi</i>	+/+
<i>C. parapsilosis</i>	+/+
<i>C. dubliniensis</i>	+/+
<i>C. tropicalis</i>	+/+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-/-
<i>Pichia pastoris</i>	-/-
<i>Serratia marcescens</i>	-/-
<i>Enterococcus faecium</i>	-/-
<i>Eterococcus faecalis</i>	-/-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-/-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-/-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-/-
<i>Homo sapiens</i>	-/-

Czułość określiłem poprzez przeprowadzenie reakcji PCR ze zmniejszającą się ilością matrycowego DNA w mieszaninie reakcyjnej. Najmniejsza ilość DNA, przy której obserwowałem pozytywny wynik reakcji uznałem za próg czułości reakcji. W związku z tym, że czułość reakcji różniła się w zależności od badanego gatunku *Candida* wybrałem wartość najwyższą spośród uzyskanych.

Tabela 48 Czułość reakcji diagnostycznych do wykrywania pan-*Candida*.

Układ	Czułość [ng DNA]
pan- <i>Candida</i> PCR	2
pan- <i>Candida</i> <i>real-time</i> PCR	0,005
t-RFLP	3

5.1.6. Podsumowanie i dyskusja wyników dotyczących układów diagnostycznych opartych o gen syntazy homocytrynianowej

Syntaza homocytrynianowa jest rozważana jako cel molekularny do terapii przeciw grzybiczej [Kur 2010]. Do głównych zalet tego celu molekularnego należy na pewno zaliczyć fakt, iż enzym ten występuje przede wszystkim u grzybów, przez co terapia może być wysoce specyficzna bez niekorzystnych oddziaływań na organizm

człowieka. Z punktu widzenia diagnostyki molekularnej fakt ograniczonego występowania tego enzymu również jest pożądanym. Brak genu kodującego syntazę homocytrynianową u bakterii i człowieka sprawia, że nie ma ryzyka powstawania produktów amplifikacji spowodowanych obecnością homologicznych genów w genomie ludzkim czy bakteryjnym. Ma to szczególnie znaczenie w przypadku próbek klinicznych, w których często obecne będzie DNA ludzkie i bakteryjne.

W wyniku analizy bioinformatycznej sekwencji genów kodujących syntazę homocytrynianową wśród drożdżaków z rodzaju *Candida* wytypowałem fragmenty genu, które występowały u wszystkich gatunków, dla których sekwencje zostały zdeponowane w bazie NCBI. Występowanie izoschizomerów tego enzymu tj. obecność dwóch sekwencji kodujących syntazę homocytrynianową wśród badanych drożdżaków stwarza dodatkowe możliwości w diagnostyce molekularnej.

Pierwszy zaproponowany w pracy układ diagnostyczny przeznaczony jest do wykrywania DNA drożdżaków *Candida* na poziomie rodzaju. Taki test może być wykonany jako wstępny etap procedury diagnostycznej mający na celu zakwalifikowanie próbki do dalszych badań ukierunkowanych do identyfikacji gatunkowej. W porównaniu do metod hodowlanych, wynik otrzymuje się maksymalnie po 3 godzinach od pobrania próbki, podczas gdy hodowle w kierunku drożdżaków trwają od 24 do 96 h. Po teoretycznej analizie sekwencji starterów i ich oddziaływań względem siebie i pomiędzy nimi, kolejnym krokiem było ich eksperymentalne sprawdzenie w reakcji PCR. Po próbach optymalizacji reakcji z wykorzystaniem pierwszej pary starterów (LysF i LysR1) stwierdziłem, że należy zmienić starter *reverse*, gdyż nie udało się wyeliminować niespecyficznego produktu reakcji. Nowy starter różnił się jednak znacząco zawartością par GC względem LysF (40% i 25%). W trakcie optymalizacji temperatury przyłączania starterów zauważyłem, iż wyniki uzyskiwane dla poszczególnych gatunków różniły się między sobą na tyle znacząco, iż niemożliwe było wyznaczenie wspólnej wartości temperatury przyłączania starterów umożliwiającej uzyskiwanie specyficznego produktu dla wszystkich badanych gatunków *Candida*. Jako rozwiązanie tego problemu zastosowałem reakcję typu *touchdown* PCR. Technika ta polega na zastosowaniu stosunkowo wysokiej temperatury hybrydyzacji starterów w początkowych etapach amplifikacji, a następnie stopniowym jej obniżaniu w kolejnych cyklach reakcji. Korzystając z tej metody uzyskałem specyficzną amplifikację dla wszystkich badanych gatunków *Candida*. Teoretycznie określona specyficzność sekwencji starterów znalazła eksperymentalne potwierdzenie skutkujące brakiem amplifikacji w przypadku obecności w mieszaninie reakcyjnej DNA pochodzącego z innych drobnoustrojów jak również dla

ludzkiego DNA. Empiryczna weryfikacja zaprojektowanych starterów spowodowała wybór tej pary starterów, która osiągnęła gorsze rezultaty analizy teoretycznej.

Pozytywne wyniki badań z wykorzystaniem genu syntazy homocytrynianowej jako celu molekularnego do wykrywania drożdżaków z rodzaju *Candida* pozwoliły na zaprojektowanie kolejnego układu diagnostycznego w oparciu o reakcję *real-time* PCR. Metoda ta zapewnia wyższą czułość, co jest niezmiernie istotnie w przypadku badania próbek klinicznych. Identyfikacja odbywa się w zamkniętym systemie detekcji co znacznie obniża ryzyko po amplifikacyjnej kontaminacji środowiska laboratorium. Konstrukcja układu diagnostycznego opartego o gen syntazy homocytrynianowej z wykorzystaniem reakcji *real-time* PCR wymagała znacznego skrócenia amplikonu. W związku z tym, że problemy z optymalizacją reakcji PCR dotyczyły startera *reverse* postanowiłem zaprojektować nowy, pozostawiając z poprzedniego układu jedynie starter *forward*, dla którego tak jak w przypadku poprzednich starterów przeprowadziłem analizę bioinformatyczną i wybrałem sekwencję charakteryzującą się najlepszymi parametrami. Weryfikacja zaprojektowanego układu została przeprowadzona z zastosowaniem klasycznej reakcji PCR, a następnie układ został zaadoptowany do amplifikacji w czasie rzeczywistym (*real-time* PCR). W obu przypadkach uzyskałem specyficzne produkty dla pięciu klinicznie istotnych gatunków z rodzaju *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*. Analiza krzywych topnienia amplikonów dla różnych gatunków *Candida* wykazała różnice w T_m powstałych produktów. Potwierdza to polimorfizm sekwencji genu syntazy homocytrynianowej w obrębie rodzaju *Candida*. Krzywe topnienia wykazują powtarzalność dla różnych szczepów w obrębie poszczególnych gatunków. Umożliwia to przypisanie do gatunku na podstawie tego parametru. Jedynie produkty amplifikacji otrzymane dla *C. albicans* i *C. tropicalis* charakteryzowały się taką samą temperaturą topnienia, co uniemożliwia ich rozróżnienie. *Candida glabrata* spośród pięciu badanych gatunków charakteryzuje się najwyższą zawartością mol% GC (44%) w genie syntazy homocytrynianowej, stąd temperatura topnienia amplikonu dla tego gatunku jest znacznie wyższa niż dla pozostałych drożdżaków.

Opracowany układ diagnostyczny ma potencjał do wykorzystania go w diagnostyce klinicznej zakażeń grzybiczych. Metoda *real-time* PCR jest bardzo czuła, a specyfika celu molekularnego minimalizuje ryzyko fałszywie pozytywnych wyników. Potencjał metody do jednoznacznej identyfikacji *C. glabrata*, *C. parapsilosis* oraz *C. krusei*, trzech gatunków istotnych z punktu widzenia podjęcia właściwego leczenia, może być rozszerzony o pozostałe gatunki *Candida* poprzez zmianę sposobu detekcji produktów

reakcji. Zaprojektowanie specyficznych gatunkowo sond pozwoliłoby uniknąć konieczności analizy temperatury topnienia amplikonów i podniosłoby specyficzność reakcji. Zastosowanie jednej pary starterów i kilku specyficznych gatunkowo sond. dałoby możliwość detekcji wszystkich klinicznie istotnych gatunków z rodzaju *Candida* w jednej mieszaninie reakcyjnej.

Polimorfizm amplifikowanego fragmentu genu syntazy homocytrynianowej potwierdzony analizą profili topnienia, skłonił mnie do zaprojektowania układu diagnostycznego, który zapewni identyfikację gatunkową sześciu klinicznie istotnych drożdżaków z rodzaju *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. dubliniensis*. W związku z tym, że wielkość amplikonu otrzymywana dla każdego z badanych gatunków *Candida* jest identyczna, postanowiłem zróżnicować poszczególne gatunki stosując analizę restrykcyjną. W celu uproszczenia wyniku diagnostycznego wykorzystałem metodę t-RFLP, w której widoczny jest jedynie fragment restrykcyjny zawierający wyznakowany fluorescencyjnie starter do reakcji PCR. Projektowanie układu przeprowadziłem w oparciu o specyficzne sekwencje amplikonów z wykorzystaniem starterów użytych do reakcji *real-time* PCR. W związku z tym, że nie były one dostępne dla *C. krusei* zsekwencjonowałem produkt reakcji PCR. Na podstawie analizy sekwencji wybrałem 3 enzymy restrykcyjne *DraI*, *BglIII*, *RsaI*. Wielkości terminalnych fragmentów restrykcyjnych uzyskiwanych dla wybranej kombinacji endonukleaz wykazują charakterystyczny dla każdego gatunku polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (tzw. wzór restrykcyjny). Dla niektórych enzymów otrzymuje się dwa terminalne produkty restrykcyjne, co jest wynikiem występowania dwóch sekwencji genów (alleli) kodujących syntazę homocytrynianową.

Podsumowując wyniki badań mających na celu konstrukcję układów diagnostycznych w oparciu o gen syntazy homocytrynianowej jako cel molekularny można stwierdzić, iż:

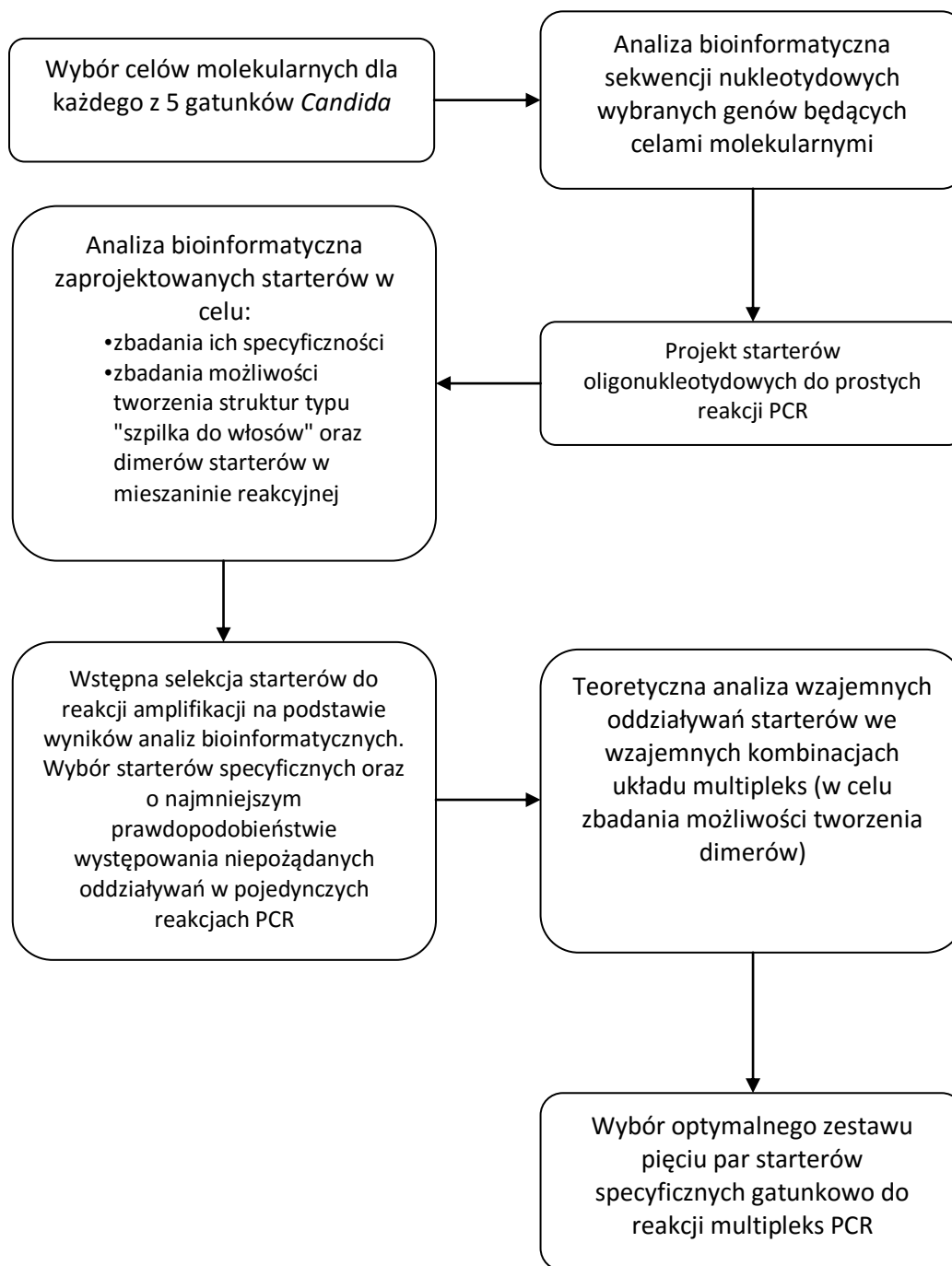
- skonstruowałem trzy układy diagnostyczne do identyfikacji drożdżaków z rodzaju *Candida*,
- dwa z nich umożliwiają wykrycie drożdżaków z rodzaju *Candida* bez różnicowania gatunkowego (identyfikacja pan-*Candida*) z czego jeden oparty jest o reakcję *touchdown* PCR, a drugi wykorzystuje reakcję *real-time* PCR,
- trzeci układ oparty o metodę t-RFLP z wykorzystaniem trzech enzymów restrykcyjnych umożliwia wykrywanie i identyfikację sześciu gatunków drożdżaków *Candida* wraz,

- wszystkie układy wykazują specyficzność wobec DNA *Candida* i nie dają wyników pozytywnych dla innych testowanych drobnoustrojów oraz ludzkiego DNA,
- największą czułością charakteryzuje się układ oparty o reakcję *real-time* PCR, natomiast najwięcej informacji diagnostycznych dostarcza metoda oparta o t-RFLP.

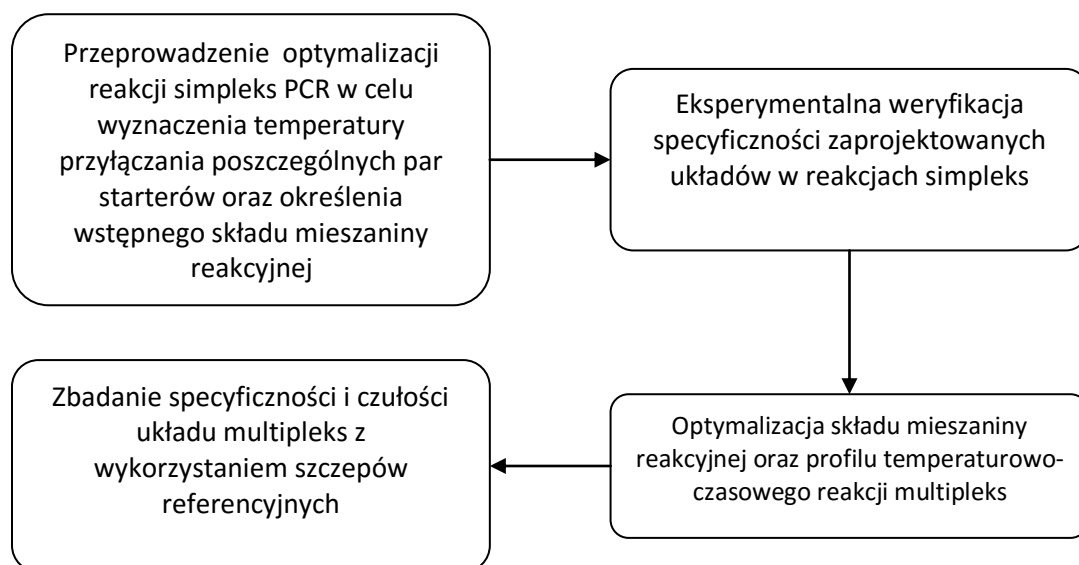
5.2. Układ multipleks PCR do identyfikacji pięciu klinicznie znaczących gatunków *Candida*

Reakcja złożonego PCR polega na amplifikacji więcej niż jednego celu molekularnego w jednej mieszaninie reakcyjnej. Wiąże się to z szeregiem zalet w porównaniu z prostą reakcją PCR. Takie podejście zmniejsza ilość zużytych odczynników oraz skraca czas przygotowania reakcji. Ponadto wymaga mniejszej ilości DNA (takiej jak dla pojedynczej reakcji) co w przypadku cennych próbek odgrywa bardzo ważną rolę. Do podstawowych wad tej metody należy zaliczyć bardziej skomplikowaną optymalizację reakcji z powodu obecności więcej niż jednej pary starterów w mieszaninie reakcyjnej, a tym samym większej ilości wzajemnych oddziaływań pomiędzy nimi. Występuje również większe prawdopodobieństwo powstawania niespecyficznych produktów oraz konieczne jest dostosowanie jednego profilu temperaturowo-czasowego reakcji. W przypadku identyfikacji produktów reakcji za pomocą elektroforezy żelowej niezbędny jest odpowiedni dobór wielkości fragmentów DNA. Należy jednak mieć na uwadze, iż zbyt duże różnice w długości powstających ampliconów mogą skutkować preferencją powstawania krótszych fragmentów co niekorzystnie wpływa na czułość reakcji. Pomimo znacznie bardziej wymagających etapów projektowania i optymalizacji metody wykorzystującej złożoną reakcję PCR to w rezultacie rutynowego stosowania opracowanych układów przynosi wymierne korzyści. Tego rodzaju podejście jest szczególnie wykorzystywane w diagnostyce, gdzie identyfikuje się wiele czynników etiologicznych i każda możliwość ograniczenia ilości przeprowadzanych reakcji skraca czas i obniża koszty badania co zwiększa potencjał aplikacyjny metody.

Kolejny układ diagnostyczny będący przedmiotem badań oparty jest o metodę multipleks PCR do wykrywania pięciu gatunków drożdżaków: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*. Projektowany układ oparty jest o pięć par specyficznych gatunkowo starterów oligonukleotydowych. W celu otrzymania zamierzonego układu diagnostycznego opracowałem schemat postępowania obejmujący etap teoretyczny (projektowania) oraz praktyczny (optymalizacji) układu multipleks PCR, który przedstawiają ryciny nr 37 i 38.



Rycina 37 Schemat teoretycznego etapu projektowania układu multipleks PCR.



Rycina 38 Schemat optymalizacji układu multipleks PCR.

5.2.1. Wybór celów molekularnych do układu multipleks PCR

Dla każdego gatunku wybrałem cel molekularny oraz dokonałem analizy bioinformatycznej w celu zaprojektowania specyficznej gatunkowo sekwencji starterów.

5.2.1.1. Gen akonitazy jako cel molekularny do wykrywania *C. albicans*

Jako cel molekularny do specyficznej identyfikacji *C. albicans* wybrałem gen akonitazy. Akonitaza jest enzymem należącym do klasy liaz. Zadaniem białka kodowanego przez gen akonitazy jest stereospecyficzna izomeryzacja cytrynianu do izocytrynianu w cyklu Krebsa.

5.2.1.1.1. Analiza bioinformatyczna sekwencji genu akonitazy

Analizy genu akonitazy dokonałem w oparciu o sekwencje dostępne w bazie NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sekwencja nukleotydowa genu akonitazy (*aco2*) dostępna była dla następujących gatunków: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, oraz *C. parapsilosis*. Korzystając z oprogramowania CLC Sequence Viewer 7 porównałem sekwencje genu dla wszystkich dostępnych gatunków pod względem długości oraz zawartości poszczególnych nukleotydów. Sporządziłem analizę porównawczą (*alignment*) sekwencji w celu zlokalizowania obszarów zakonserwowanych, w oparciu o które możliwe byłoby zaprojektowanie starterów do reakcji PCR. W wyniku analizy dostępnych sekwencji nukleotydowych genu akonitazy dla grzybów z rodzaju *Candida* otrzymałem wyniki, które przedstawia tabela nr 49.

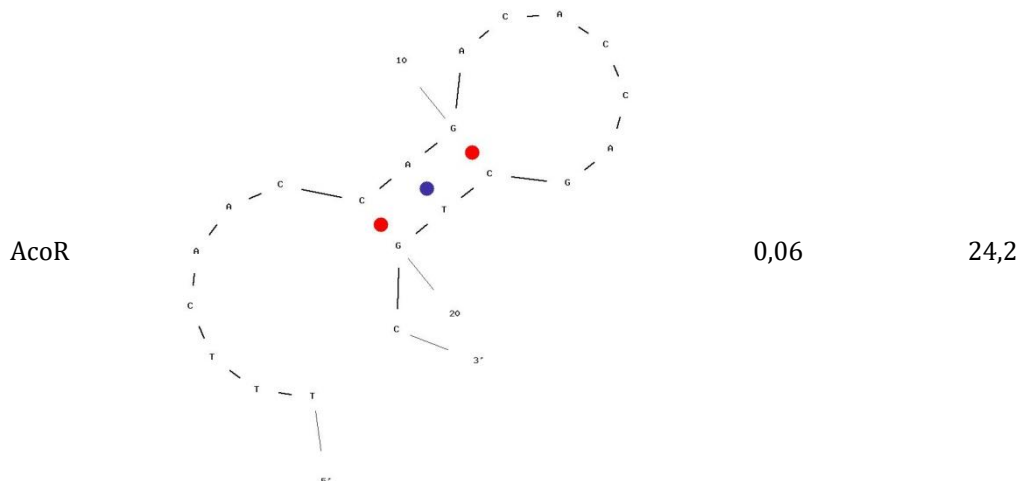


Tabela 51 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu selfdimer dla starterów AcoF i AcoR.

Starter	Struktura	ΔG [kcal*mol ⁻¹]	Liczba komplementarnych nukleotydów
AcoF	<pre> 5' GGCAAATTATCTGGATGGAGCTCGCCT 3' TCCGCTCGAGGTAGGTCTATT</pre>	-9,49	6
	<pre> 5' GGCAAATTATCTGGATGGAGCTCGCCT : : : : : : : : 3' TCCGCTCGAGGTAGGTCTATTAAACGG</pre>	-6,21	3
	<pre> 5' GGCAAATTATCTGGATGGAG : : 3' TCCGCTCGAGGTAGGTCTATTAAACGG</pre>	-5,36	4
AcoR	<pre> 5' TTTCAACCAGACACCAGCTGC 3' CGTCGACCACAGACCAACTTT</pre>	-10,24	6
	<pre> 5' TTTCAACCAGACACCAGCTGC ::: 3' CGTCGACCACAGACCAACTTT</pre>	-3,55	3

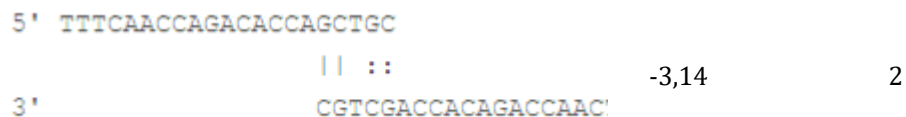


Tabela 52 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami AcoF i AcoR.

Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Liczba komplementarnych nukleotydów
<pre> 5' TTTCAACCAGACACCAGCTGC : :: : 3' TCCGCTCGAGGTAGGTCTATTAAACGG </pre>	-8,2	5
<pre> 5' TTTCAACCAGACACCAGCTGC : : : : 3' TCCGCTCGAGGTAGGTCTATTAAACGG </pre>	-6,62	4
<pre> 5' TTTCAACCAGACACCAGCTGC : : : 3' TCCGCTCGAGGTAGGTCTATTAAACGG </pre>	-6,34	4

Dobór sekwencji, które mogłyby być celem do hybrydyzacji starterów oligonukleotydowych był znacznie ograniczony z powodu dużej homologii sekwencji pomiędzy *C. albicans* i *C. dubliniensis*. Analiza możliwości występowania struktur typu "szpilki do włosów" nie wykazała wysokich wartości energii tego rodzaju oddziaływań, a ich teoretyczna temperatura topnienia jest znacznie poniżej zakresu temperatur przyłączania starterów w reakcji PCR. Ryzykiem do wydajnej amplifikacji są oddziaływania międzycząsteczkowe. W szczególności występowanie homodimerów starterów o wartościach entalpii swobodnej około $-10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Jest to dwukrotnie więcej niż zakładają teoretyczne wymagania dla projektowania starterów. Ponadto dla obu starterów w wyniku tworzenia tego rodzaju struktur powstają wolne końce 3', które umożliwiają reakcję polimeryzacji nici DNA. W przypadku obu starterów nie ma jednak 100% komplementarności na końcu 3' co zdecydowanie zmniejsza prawdopodobieństwo wydłużenia nici przez polimerazę. Niemniej jednak, o ile w przypadku startera AcoF są to cztery wiszące nukleotydy to dla startera AcoR niesparowany jest jedynie jeden nukleotyd. Występowanie struktur typu heterodimer nie niesie ze sobą dużego ryzyka dla reakcji bowiem dla struktury o najniższej entalpii swobodnej wynoszącej $-8,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ nie ma

możliwości wydłużenia nici przez polimerazę więc zastosowanie odpowiednio wysokiej temperatury przyłączania starterów w reakcji powinno skutecznie zapobiegać tego rodzaju oddziaływaniom. Pomimo względnie niekorzystnych parametrów dla zaprojektowanej pary starterów postanowiłem wybrać je do sprawdzenia w reakcji PCR, mając na uwadze ich wysoką specyficzność względem *C. albicans*. Ponadto postanowiłem zoptymalizować reakcję PCR z wykorzystaniem buforów do reakcji PCR mających na celu obniżenie stabilności struktur dwuniciowych o niepełnej komplementarności zasad.

5.2.1.1.3. Optymalizacja warunków reakcji PCR do specyficznej identyfikacji *C. albicans*

Po zaprojektowaniu starterów przeprowadziłem optymalizację reakcji PCR, w celu uzyskania wydajnej i specyficznej amplifikacji fragmentu genu *aco2*. W pierwszej kolejności przeprowadziłem reakcję PCR w gradiencie temperatury przyłączania starterów przy zastosowaniu buforów reakcyjnych zawierających różne sole takich jak bufor TaqNova z KCl lub NH_4SO_4 firmy BLIRT S.A. [Materiały i metody 3.5.]. W celu empirycznego ustalenia wartości tego parametru przeprowadziłem szereg reakcji stosując gradient temperatury przyłączania starterów w zakresie 69-72°C. Skład mieszanin reakcyjnych oraz profil temperaturowo-czasowy przedstawiają tabele nr 53 i 54.

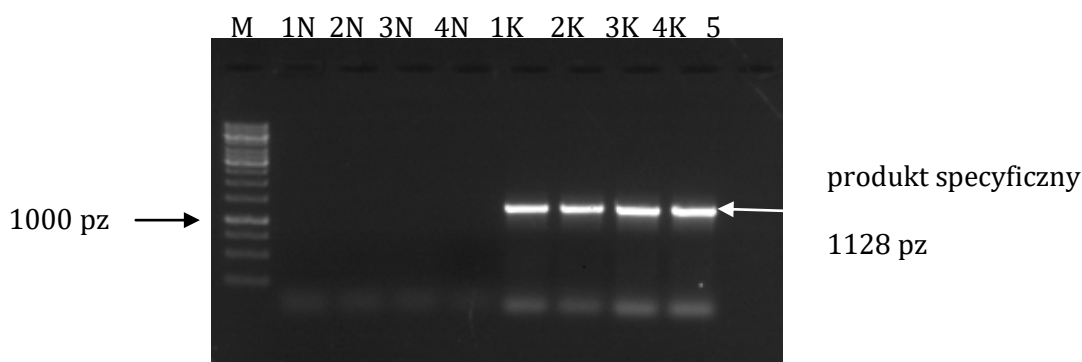
Tabela 53 Skład mieszaniny reakcyjnej do optymalizacji buforu reakcyjnego do amplifikacji fragmentu genu akonitazy.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
bufor TaqNova KCl lub NH_4SO_4 10x	2,5	1x
dNTPs [8mM]	2,5	0,8 mM
MgCl_2 [25mM]	2,5	2,5 mM
starter AcoF [10 μM]	1	0,4 μM
starter AcoR [10 μM]	1	0,4 μM
polimeraza Taq [2U/ μl]	0,5	0,04 U/ μl
woda	14	-
DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 [23 ng/ μl]	1	0,92 ng/ μl

Tabela 54 Profil temperaturowo-czasowy optymalizacji temperatury przyłączania starterów w reakcji PCR do amplifikacji fragmentu genu akonitazy.

Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	Czas [s]	Cykle
94	180	
94	30	
69-72	30	30
72	60	
72	180	

Wynik reakcji przedstawia rycina nr 39



Rycina 39 Wynik rozdziálu elektroforetycznego w 1,0 % żelu agarozowym produktów reakcji PCR w gradiencie temperatury przyłączania starterów z wykorzystaniem buforów reakcyjnych z KCl i NH_4SO_4 . M-marker wielkości DNA 1kb (Fermentas), Ścieżki od 1 do 4 –oznaczają odpowiednio temperatury: 69 °C, 70 °C, 71 °C, 72°C. ścieżka nr 5 oznacza kontrolę ujemną reakcji PCR. K oznacza bufor z KCl, natomiast N z NH_4Cl .

Otrzymany wynik wskazuje na to, iż zaprojektowane startery wykazują bardzo wysoką specyficzność wobec matrycowego DNA *C. albicans*, gdyż uzyskałem wydajną amplifikację nawet w temperaturze przyłączania starterów 72 °C. Jednocześnie można stwierdzić, iż bufor z KCl zapewnia lepsze warunki dla polimerazy w tym układzie. Dla buforu z NH_4SO_4 nie uzyskałem amplikonów.

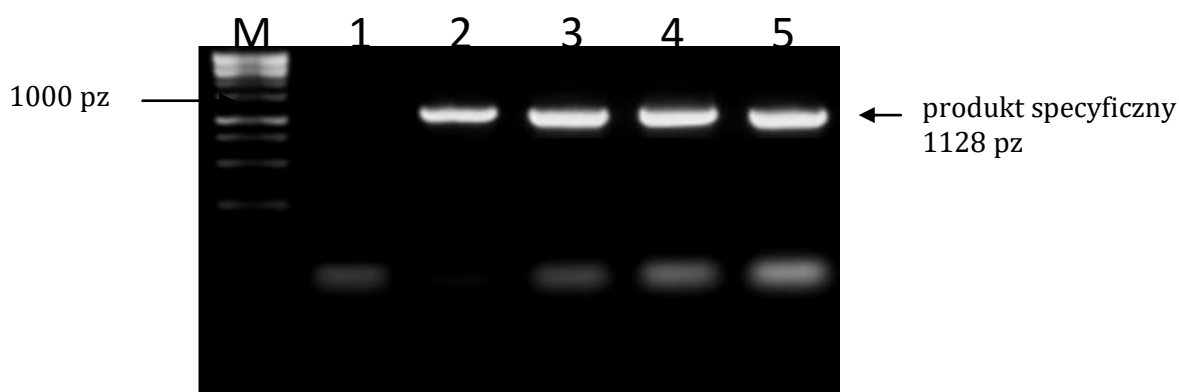
Dla ustalonej temperatury przyłączania starterów oraz wybranego buforu przeprowadziłem optymalizację stężenia starterów w reakcji PCR. Zastosowałem profil temperaturowo czasowy reakcji zgodny z tabelą nr 56. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiłem w tabeli nr 55 natomiast wynik eksperymentu na rycinie nr 40.

Tabela 55 Skład mieszaniny reakcyjnej do optymalizacji stężenia starterów w reakcji amplifikacji fragmentu genu akonitazy.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
bufor TaqNova KCl 10x	2,5	1x
dNTPs [8mM]	2,5	0,8 mM
MgCl_2 [25mM]	2,5	2,5 mM
starter AcoF [10 μM]	gradient stężenia	-
starter AcoR [10 μM]	gradient stężenia	-
polimeraza Taq [0,5U/ μl]	0,5	0,04 U/ μl
woda	14	-
DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 [23 ng/ μl]	1	0,92 ng/ μl

Tabela 56 Zoptymalizowany profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR do amplifikacji fragmentu genu akonitazy.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
94	180	30
94	30	
72	90	
72	180	



Rycina 40 Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2 % żelu agarozowym produktów reakcji PCR w gradiencie stężenia starterów. M – marker wielkości DNA 1kb (Fermentas), ścieżka nr 1 - kontrola ujemna, ścieżki 2, 3, 4, 5 oznaczają odpowiednio ilości każdego ze starterów w mieszaninie reakcyjnej: 5 pmoli, 10 pmoli, 15 pmoli, 20 pmoli.

Uzyskane wyniki wskazują, że nawet przy użyciu 5 pmoli każdego startera w mieszaninie reakcyjnej uzyskuje się wydajny produkt amplifikacji. Potwierdza to ich wysoką specyficzność względem *C. albicans*.

5.2.1.1.4. Specyficzność opracowanego układu do identyfikacji *C. albicans*

Opracowany układ zbadałem pod kątem specyficzności poprzez przeprowadzenie reakcji PCR z dodatkiem DNA grzybowego, bakteryjnego i ludzkiego. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy reakcji przedstawiają odpowiednio tabele nr 57 i nr 56.

Tabela 57 Skład zoptymalizowanej mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu akonitazy.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
bufor TaqNova KCl 10x	2,5	1x
dNTPs [8mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25mM]	2,5	2,5 mM
starter AcoF [10 μM]	1	0,4 μM
starter AcoR [10 μM]	1	0,4 μM
polimeraza Taq [0,5U/ μl]	0,5	0,04 U/ μl
woda	14	-
DNA genomowe *	1	-

* *C. albicans* [23 ng/ μl], *C. glabrata* [26 ng/ μl], *C. krusei* [31 ng/ μl], *C. parapsilosis* [24 ng/ μl], *C. tropicalis* [19 ng/ μl], *Saccharomyces cerevisiae* [20 ng/ μl], *Pichia pastoris* [19 ng/ μl], *Serratia marcescens* [45 ng/ μl], *Enterococcus faecium* [25 ng/ μl], *Enterococcus faecalis* [26 ng/ μl], *Klebsiella oxytoca* [58 ng/ μl], *Staphylococcus aureus* [22 ng/ μl], *Pseudomonas aeruginosa* [33 ng/ μl], *Acinetobacter baumannii* [36 ng/ μl], *Escherichia coli* [44 ng/ μl], *Homo sapiens* [25 ng/ μl].

Wyniki przedstawia tabela nr 58.

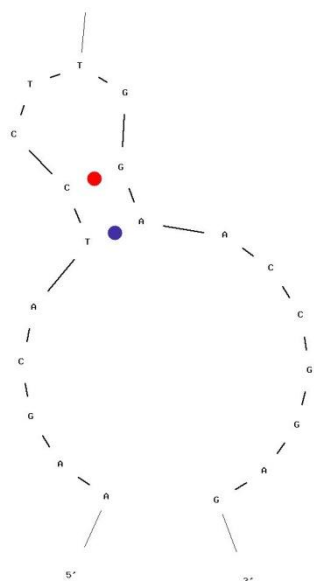
Tabela 58 Specyficzność układu do identyfikacji *C. albicans*.

Gatunek	Wynik reakcji
<i>C. albicans</i>	+
<i>C. glabrata</i>	-
<i>C. krusei</i>	-
<i>C. parapsilosis</i>	-
<i>C. tropicalis</i>	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
<i>Pichia pastoris</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-
<i>Homo sapiens</i>	-

5.2.1.2. Gen enolazy jako cel molekularny do wykrywania *C. krusei*

Do identyfikacji *Candida krusei* został wybrany gen *eno1* kodujący enolazę, należącą do klasy liaz. Enzym ten odpowiedzialny jest za przeprowadzanie przedostatniej reakcji w procesie glikolizy. Reakcja ta, której katalizatorem jest enolaza polega na dehydratacji 2 fosfoglicerynianu w wyniku czego powstaje 2 fosfoenolopirogronian.

EnoR



-0,17

28,2

Tabela 60 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu self-dimer dla starterów EnoF i EnoR.

Starter	Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Liczba komplementarnych nukleotydów
EnoF	<pre> 5' TGCCATTCTTGGTGTCTCCC ::: 3' CCCTCTGTGGTTCTTACCGT </pre>	-5,02	3
	<pre> 5' TGCCATTCTTGGTGTG 3' CCCTCTGTGGTTCTTACCGT </pre>	-3,14	2
	<pre> 5' TGCCATTCTTGGTGTCTCCC : : : : 3' CCCTCTGTGGTTCTTACCGT </pre>	-3,07	2
EnoR	<pre> 5' AAGCATCCTTGGAAACCGGAG 3' GAGGCCAAGGTTCTTACG </pre>	-9,75	4
	<pre> 5' AAGCATCCTTGGAAACCGGAG : ::: : 3' GAGGCCAAGGTTCTTACGAA </pre>	-4,64	3

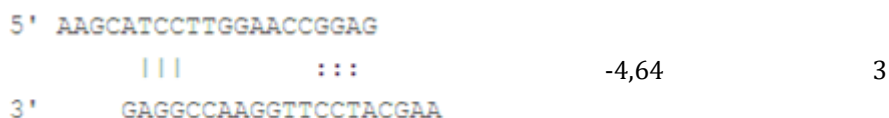


Tabela 61 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami EnoF i EnoR.

Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Liczba komplementarnych nukleotydów
<pre> 5' AAGCATCCTTGAACCGGAG 3' CCCTCTGTGGTTCTTACCGT </pre>	-6,24	4
<pre> 5' AAGCATCCTTGAACCGGAG 3' CCCTCTGTGGTTCTTACCGT </pre>	-5,09	3
<pre> 5' AAGCATCCTTGAACCGGAG : :: : 3' CCCTCTGTGGTTCTTACCGT </pre>	-5,02	3

Analiza występowania struktur typu "szpilka do włosów" nie wykazała występowania oddziaływań o znaczącej wartości entalpii swobodnej. W przypadku prawdopodobnych struktur powstających na skutek oddziaływania międzycząsteczkowego jedynie jedna znacząco przekraczała wartość -5 kcal*mol^{-1} . Wystąpiła ona dla homodimeru startera EnoR i wyniosła $-9,75 \text{ kcal*mol}^{-1}$. Mimo tego, że skutkuje ona powstaniem wolnego końca 3' i możliwością dołączania kolejnych nukleotydów przez polimerazę DNA to występują na tym końcu dwa niekomplementarne nukleotydy, które znacząco obniżają prawdopodobieństwo wydłużenia cząsteczki startera. Ryzykiem dla wydajnej amplifikacji w przypadku tego układu jest również struktura heterodimeru o entalpii swobodnej $-6,24 \text{ kcal*mol}^{-1}$ z jednym niekomplementarnym nukleotydem na końcu 3'. Jednak wartość energii oddziaływania nieznacznie przekracza teoretycznie dopuszczalną granicę na poziomie -5 kcal*mol^{-1} przez co, przy odpowiednim doborze profilu temperaturowo-czasowego reakcji nie powinna negatywnie wpływać na przebieg amplifikacji.

5.2.1.2.2. Optymalizacja warunków reakcji PCR do specyficznej identyfikacji *C. krusei*

Pierwszym etapem badań było sprawdzenie czy zaprojektowane oligonukleotydy będą dawały oczekiwany produkt o długości 103 pz. Zastosowałem klasyczną reakcję PCR, stosując gradient temperatury przyłączania starterów. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil-temperaturowo czasowy przedstawiłem w tabelach nr 62 i 63.

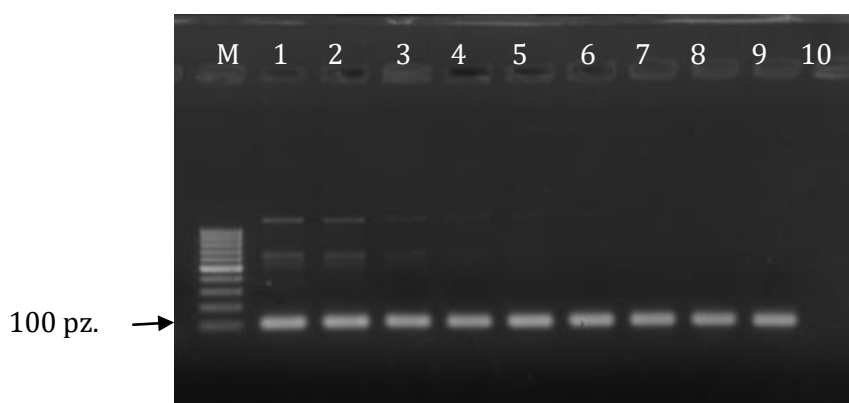
Tabela 62 Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu enolazy.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
bufor TaqNova KCl 10x	2,5	1x
dNTPs [8 mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25 mM]	2,5	2,5 mM
Enof [10 μM]	1	0,4 μM
Enor [10 μM]	1	0,4 μM
Polimera za TaqNova [2U/μl]	0,5	0,04 U/μl
woda	14	-
DNA <i>C. krusei</i> ATCC 6258 [31 ng/μl]	1	1,24 ng/μl

Tabela 63 Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR do optymalizacji temperatury hybrydyzacji starterów dla amplifikacji fragmentu genu enolazy.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
94	120	
94	30	
gradient temp.	30	30
72	15	
72	180	

Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji przedstawiłem na rycinie nr 41.



Rycina 41 Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2 % żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu enolazy w gradiencie temperatury hybrydyzacji starterów. M-marker wielkości 100-1000, ścieżki 1-9 temperatury przyłączania starterów odpowiednio: 55 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 10-kontrola ujemna.

Uzyskałem wydajną i specyficzną amplifikację pożądanego fragmentu dla temperatury hybrydyzacji powyżej 58 °C.

5.2.1.2.3. Specyficzność układu do identyfikacji *C. krusei*

Opracowany układ zbadałem pod kątem specyficzności poprzez przeprowadzenie reakcji PCR z dodatkiem DNA grzybowego, bakteryjnego i ludzkiego zgodnie z warunkami przedstawionymi w tabelach nr 64 i 65.

Tabela 64 Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu enolazy.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
bufor TaqNova KCl 10x	2,5	1x
dNTPs [8 mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25 mM]	2,5	2,5 mM
Enof [10 μM]	1	0,4 μM
Enor [10 μM]	1	0,4 μM
Polimera za TaqNova [2U/μl]	0,5	0,04 U/μl
woda	14	-
DNA genomowe*	1	-

* *C. albicans* [23 ng/μl], *C. glabrata* [26 ng/μl], *C. krusei* [31 ng/μl], *C. parapsilosis* [24 ng/μl], *C. tropicalis* [19 ng/μl], *Saccharomyces cerevisiae* [20 ng/μl], *Pichia pastoris* [19 ng/μl], *Serratia marcescens* [45 ng/μl], *Enterococcus faecium* [25 ng/μl], *Enterococcus faecalis* [26 ng/μl], *Klebsiella oxytoca* [58 ng/μl], *Staphylococcus aureus* [22 ng/μl], *Pseudomonas aeruginosa* [33 ng/μl], *Acinetobacter baumannii* [36 ng/μl], *Escherichia coli* [44 ng/μl], *Homo sapiens* [25 ng/μl].

Tabela 65 Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR do amplifikacji fragmentu genu enolazy.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
94	120	
94	30	30
72	30	
72	180	

Wyniki przedstawia tabela nr 66.

Tabela 66 Specyficzność układu do identyfikacji *C. krusei*.

Gatunek	Wynik reakcji
<i>C. albicans</i>	-
<i>C. glabrata</i>	-
<i>C. krusei</i>	+
<i>C. parapsilosis</i>	-
<i>C. tropicalis</i>	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
<i>Pichia pastoris</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-
<i>Homo sapiens</i>	-

5.2.1.3. Gen *trf4* jako cel molekularny do identyfikacji *C. tropicalis* oraz *C. glabrata*

Do identyfikacji *C. tropicalis* oraz *C. glabrata* wybrałem gen *trf4*, który koduje białko zaangażowane w procesie mitotycznej kondensacji chromosomów. Białko *trf4* asocjuje z białkami *smc1p* i *smc2p*, które wiążą się bezpośrednio do chromosomów powodując ich kondensację.

5.2.1.3.1. Analiza bioinformatyczna starterów do reakcji PCR

Na podstawie sekwencji genu *trf4* dla *C. tropicalis* oraz *C. glabrata* zaprojektowałem specyficzne startery oligonukleotydowe. Wykonując teoretyczne analizy i porównania wybrałem optymalną długość i sekwencje starterów. Wyniki analiz występowania struktur typu "szpilki do włosów" oraz dimerów starterów przedstawiają tabele nr 67-72.

Tabela 67 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla starterów TropF i TropR.

Starter	Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Tm [°C]
TropF		0,11	23,7

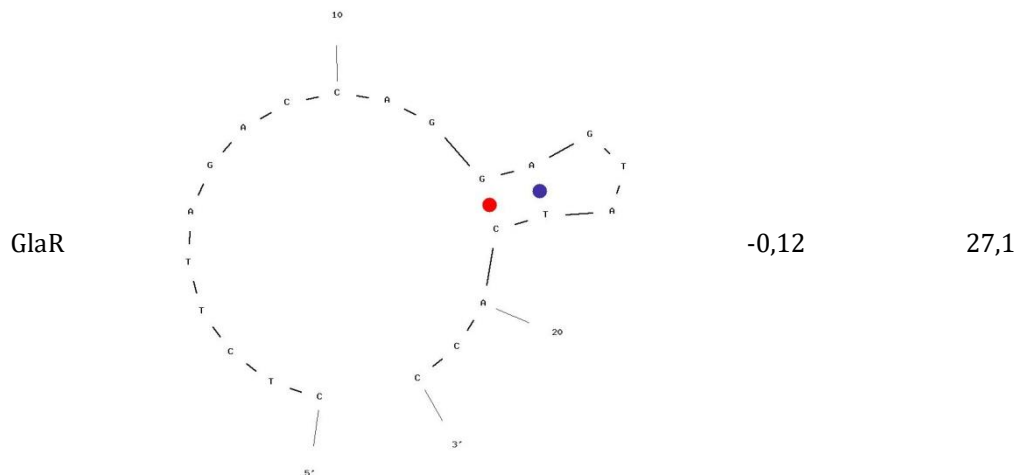


Tabela 71 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu selfdimer dla starterów GlaF i GlaR.

Starter	Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Liczba komplementarnych nukleotydów
	<pre> 5' GTGGTGATAAAAGAAAATAGAGAGTACC : : : : :: 3' CCATGAGAGATAAAAGAAAATAGTGGTG </pre>	-4,41	3
GlaF	<pre> 5' GTGGTGATAAAAGAAAATAGAGAGTACC 3' CCATGAGAGATAAAAGAAAATAGTGGTG </pre>	-3,65	4
	<pre> 5' GTGGTGATAAAAGAAAATAG : : : : 3' CCATGAGAGATAAAAGAAAATAGTGGTG </pre>	-1,47	2
	<pre> 5' CTCTTAGACCAGGAGTATCCT ::: 3' CCACTATGAGGACCAGATTCTC </pre>	-3,17	3
GlaR	<pre> 5' CTCTTAGACCAGGAGTATCACC : : : : :: 3' CCACTATGAGGACCAGATTCTC </pre>	-3,17	3
	<pre> 5' CTCTTAGACCAGGAGTATCACC : :: :: : : 3' CCACTATGAGGACCAGATTCTC </pre>	-3,07	2

Tabela 72 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami GlaF i GlaR.

Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Liczba komplementarnych nukleotydów
<pre> 5' CTCTTAGACCAGGAGTATCACC : : 3' CCATGAGAGATAAAAAGAAATAGTGGTG </pre>	-10,38	7
<pre> 5' CTCTTAGACCAGGAGTATCACC :: : 3' CCATGAGAGATAAAAAGAAATAGTGGTG </pre>	-6,37	4
<pre> 5' CTCTTAGACCAGGAGTATCACC : 3' CCATGAGAGATAAAAAGAAATAGTGGTG </pre>	-5,12	4

Analiza oddziaływania wewnątrzcząsteczkowego dla zaprojektowanych sekwencji starterów nie wykazała występowania takich struktur typu "szpilek do włosów", które mogłyby wpłynąć na wydajność amplifikacji. Również wartości entalpii swobodnej oddziaływań międzycząsteczkowych dla struktur typu homo dimer dla wszystkich starterów oraz hetero dimer dla starterów TropF i TropR nie przekraczały 5 kcal* mol^{-1} . Ryzykiem dla powodzenia optymalizacji reakcji amplifikacji jest wysoka bezwzględna wartość entalpii swobodnej tworzenia hetero dimerów dla pary starterów GlaF i GlaR o wartości 10,38 kcal* mol^{-1} . Niemniej jednak powstający dimer nie zapewnia wolnego końca 3' co sprawia, że skutecznym przeciwdziałaniem obniżenia wydajności reakcji PCR może być dobór odpowiedniego profilu temperaturowo-czasowego reakcji PCR, a szczególnie temperatury przyłączania starterów.

5.2.1.3.2. Optymalizacja warunków reakcji PCR do specyficznej identyfikacji *C. krusei*

Nowo zaprojektowane układy do identyfikacji *C. glabrata* i *C. tropicalis* wymagały weryfikacji ich specyficzności oraz wstępnej optymalizacji warunków. Zastosowałem proste reakcje PCR dla których skład mieszanin reakcyjnych oraz profil reakcji został podany w tabelach 73 i 74.

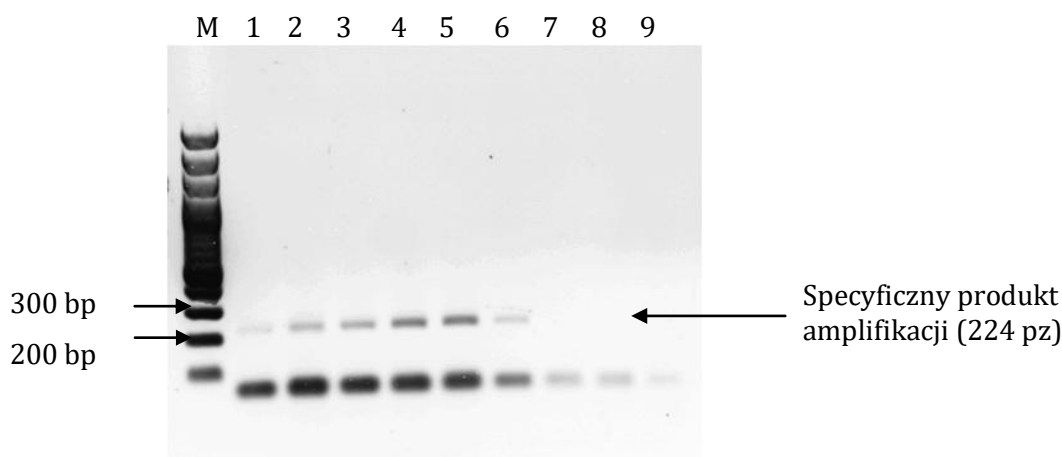
Tabela 73 Skład mieszanin reakcyjnych do amplifikacji fragmentów genu *trf4* specyficznych dla *C. tropicalis* i *C. glabrata*.

Odczynnik	Objętość [μ l]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
bufor TaqNova KCl 10x	2,5	1x
dNTPs [8 mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25 mM]	2,5	2,5 mM
GlaF/TropF [10 μ M]	1	0,4 μ M
GlaR/TropR [10 μ M]	1	0,4 μ M
Polimeraza TaqNova [2U/ μ l]	0,5	0,04 U/ μ l
woda	14	-
DNA <i>C. glabrata</i> ATCC 2001 [26 ng/ μ l]/ <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 [19 ng/ μ l]	1	1,04/0,76 ng/ μ l

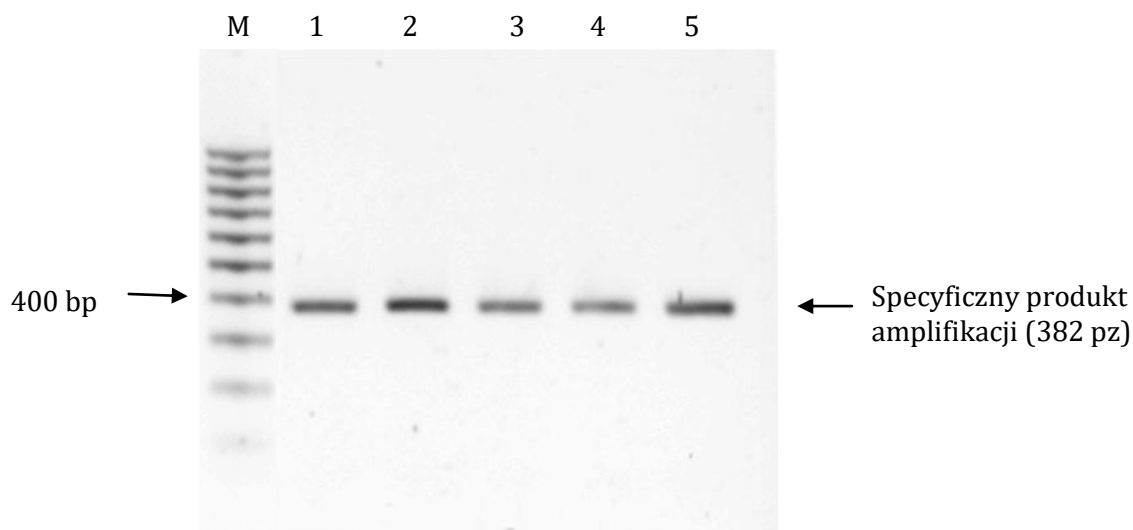
Tabela 74 Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR do optymalizacji temperatury hybrydyzacji fragmentów genu *trf4* dla *C. tropicalis* i *C. glabrata*.

Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas [s]	Cykle
94	120	
94	30	
Gradient temp.	30	30
72	30	
72	180	

Poniżej na rycinach nr 42 i 43 przedstawiłem wyniki rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji fragmentów genu *trf4* w gradiencie temperatury przyłączania starterów dla *C. tropicalis* i *C. glabrata*.



Rycina 42 Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2 % żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu *trf4* w gradiencie temperatury hybrydyzacji starterów GlaF i GlaR. M-marker wielkości 100-3000, ścieżki 1-8 temperatury przyłączania starterów odpowiednio: 55 $^{\circ}$ C, 57 $^{\circ}$ C, 59 $^{\circ}$ C, 61 $^{\circ}$ C, 63 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C, 67 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ C, 9-kontrola negatywna.



Rycina 43 Wynik rozdziálu elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu *trf4* w gradiencie temperatury hybrydyzacji starterów TropF i TropR. M-marker wielkości 100-1000, ścieżki 1-5 temperatury przyłączenia starterów odpowiednio: 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, 71 °C.

Wyniki uzyskane dla amplifikacji fragmentu genu *trf4* wskazują na poprawność zaprojektowanych starterów oligonukleotydowych, gdyż w obu przypadkach, dla *C. tropicalis* i *C. glabrata* uzyskałem specyficzne amplikony o założonej długości (odpowiednio 382 i 224 pz).

5.2.1.3.2.1. Specyficzność układów do identyfikacji *C. tropicalis* oraz *C. glabrata*

Opracowane układy zbadalem pod kątem specyficzności poprzez przeprowadzenie reakcji PCR z dodatkiem DNA grzybowego, bakteryjnego i ludzkiego. Składy mieszanin reakcyjnych oraz profile temperaturowo-czasowe zawierają tabele nr 75 i 76.

Tabela 75 Skład mieszanin reakcyjnych do amplifikacji fragmentów genu *trf4* - badanie specyficzności.

Odczynnik	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
bufor TaqNova KCl 10x	2,5	1x
dNTPs [8 mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25 mM]	2,5	2,5 mM
GlaF/TropF [10 μM]	1	0,4 μM
GlaR/TropR [10 μM]	1	0,4 μM
Polimeraza TaqNova [2U/μl]	0,5	0,04 U/μl
woda	14	-
DNA genomowe*	1	-

* *C. albicans* [23 ng/μl], *C. glabrata* [26 ng/μl], *C. krusei* [31 ng/μl], *C. parapsilosis* [24 ng/μl], *C. tropicalis* [19 ng/μl], *Saccharomyces cerevisiae* [20 ng/μl], *Pichia pastoris* [19 ng/μl], *Serratia marcescens* [45 ng/μl], *Enterococcus faecium* [25 ng/μl], *Enterococcus faecalis* [26 ng/μl], *Klebsiella oxytoca* [58 ng/μl], *Staphylococcus aureus* [22 ng/μl], *Pseudomonas aeruginosa* [33 ng/μl], *Acinetobacter baumannii* [36 ng/μl], *Escherichia coli* [44 ng/μl], *Homo sapiens* [25 ng/μl].

Tabela 76 Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR do amplifikacji fragmentów genu *trf4*.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
94	120	
94	30	
61	30	30
72	30	
72	180	

Wyniki przedstawia tabela nr 77.

Tabela 77 Specyficzność układów do identyfikacji *C. glabrata* i *C. tropicalis*.

Gatunek	Wynik reakcji (<i>C. glabrata</i> / <i>C. tropicalis</i>)
<i>C. albicans</i>	-/-
<i>C. glabrata</i>	+/-
<i>C. krusei</i>	-/-
<i>C. parapsilosis</i>	-/-
<i>C. tropicalis</i>	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-/+
<i>Pichia pastoris</i>	-/-
<i>Serratia marcescens</i>	-/-
<i>Enterococcus faecium</i>	-/-
<i>Eterococcus faecalis</i>	-/-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-/-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-/-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-/-
<i>Homo sapiens</i>	-/-

5.2.1.4. Specyficzna identyfikacja *C. parapsilosis*

Do specyficznej identyfikacji *C. parapsilosis* za pomocą złożonej reakcji PCR wybrałem układ będący wynikiem nieopublikowanych badań prowadzonych w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Jako cel molekularny wykorzystuje fragment genu *FKS1*. Koduje on podjednostkę katalityczną syntazy 1,3-beta-D glukanu. Układ ten wybrałem ponieważ specyfika starterów do reakcji PCR pozwalała na teoretyczne wykorzystanie ich w reakcji multipleks PCR w połączeniu z dotychczas opracowanymi przeze mnie układami. Ponadto wielkość ampliconu była odpowiednia do bezproblemowej interpretacji wyników. W związku z tym, że układ ten został już opracowany nie przeprowadziłem dla niego

optymalizacji i weryfikacji w układzie simpleks PCR. Amplikon specyficzny dla *C. parapsilosis* powinien mieć wielkość 195 pz.

5.2.2. Opracowanie złożonej reakcji PCR (multipleks PCR)

5.2.2.1. Analiza bioinformatyczna starterów do reakcji multipleks PCR

W związku z tym, że podczas reakcji multipleks PCR w mieszaninie reakcyjnej jednocześnie znajdują się wszystkie startery do identyfikacji gatunkowej pięciu gatunków *Candida* prawdopodobieństwo wystąpienia niepożądanych oddziaływań pomiędzy oligonukleotydami, jak również powstawanie niespecyficznych produktów reakcji PCR jest wysokie, przed przystąpieniem do optymalizacji reakcji multipleks PCR przeprowadziłem analizę bioinformatyczną starterów. Przeanalizowałem możliwość tworzenia dimerów oligonukleotydów jak również powstawania niespecyficznych produktów reakcji PCR w wyniku krzyżowych oddziaływań z matrycami DNA. Teoretyczna analiza wszystkich kombinacji starterów oligonukleotydowych obecnych w mieszaninie reakcyjnej na podstawie sekwencji dostępnych w bazie NCBI nie wykazała teoretycznej możliwości powstawania niespecyficznych produktów. Na podstawie przeprowadzonych analiz wybrałem najbardziej prawdopodobne oddziaływania pomiędzy oligonukleotydami. Zestawienie przedstawia tabela nr 78.

Tabela 78 Najbardziej prawdopodobne oddziaływania starterów w reakcji multipleks PCR.

Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Oligonukleotydy
<pre> 5' GGCAAATTATCTGGATGGAGCTCGCCT :: : :: 3' CCACTATGAGGACCAGATTCTC </pre>	-6,62	AcoF/GlaR
<pre> 5' GGCAAATTATCTGGATGGAGC 3' CCCTCTGTGGTTCTTACCGT </pre>	-8,16	AcoF/EnoF
<pre> 5' GGCAAATTATCTGGATGGAGCTCGCCT : : : : : : 3' GCTGGGTCATAGTCTTTGATGA </pre>	-4,01	AcoF/TropF
<pre> 5' TTTCAACCAGACACCAGCTGC : 3' GTGTTGGCTACGATACTCAC </pre>	-8,31	AcoR/TropR

5' TGCCATTCTTGGTGTCTCCC :: : :: :	-6,37	EnoF/GlaR
3' CCACTATGAGGACCAGATTCTC		
5' GGGAATAGAGATTTCGTTTCTCCAG : : :	-6,24	ParF/GlaR
3' CCACTATGAGGACCAGATTCTC		
5' GGGAATAGAGATTTCGTTTCTCCAG :: : :	-7,06	ParF/GlaF
3' CCATGAGAGATAAAAAGAAATAGTGGTG		

Wyniki analizy występowania prawdopodobnych oddziaływań międzycząsteczkowych wszystkich starterów obecnych w mieszaninie reakcyjnej do amplifikacji pięciu specyficznych gatunkowo celów molekularnych pozwoliły na zidentyfikowanie dwóch struktur mogących stanowić ryzyko dla skutecznej amplifikacji w złożonej reakcji PCR. Wartości ich entalpii swobodnych wynosiły $-8,16$ i $-8,31$ kcal* mol^{-1} . W przypadku pierwszej z nich nie powstaje wolny koniec 3' co znacząco zmniejsza prawdopodobieństwo obniżenia wydajności reakcji PCR. Druga struktura będąca wynikiem oddziaływania starterów AcoR i TropR charakteryzuje się wolnym końcem 3', niemniej jednak znajdują się na nim dwa niesparowane nukleotydy co ogranicza możliwość zmiany sekwencji startera poprzez dołączenie kolejnych nukleotydów przez polimerazę DNA.

Po przeanalizowaniu wyników dotyczących optymalnej temperatury hybrydyzacji starterów ustaliłem wspólną temperaturę 62 °C dla wszystkich oligonukleotydów uczestniczących w reakcji multipleks PCR.

5.2.2.2. Optymalizacja warunków reakcji dla układu multipleks PCR do identyfikacji pięciu klinicznie istotnych gatunków *Candida*

Po weryfikacji specyficzności poszczególnych układów przeprowadziłem optymalizację reakcji multipleks PCR. Optymalizacji poddałem przede wszystkim stężenie poszczególnych par starterów oligonukleotydowych tak, aby powstawały jedynie specyficzne gatunkowo produkty amplifikacji, Zweryfikowałem również poprawność wyznaczonej temperatury przyłączania starterów. Stężenie jonów magnezu oraz polimerazy pozostała na poziomie zoptymalizowanym dla reakcji simpleks PCR. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zoptymalizowanej reakcji przedstawiłem w tabelach nr 79 i 80.

Tabela 79 Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji 5 celów molekularnych w reakcji multipleks PCR.

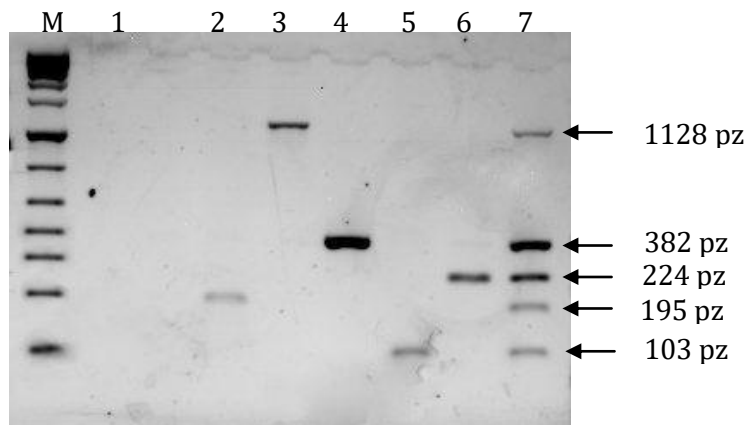
Odczynniki	Objętość [μ l]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
bufor TaqNova KCl 10x	2,5	1x
dNTPs [8mM]	2,5	0,8 mM
MgCl ₂ [25mM]	2,5	2,5 mM
EnoF [10 μ M]	1	0,4 μ M
EnoR [10 μ M]	1	0,4 μ M
AcoF [10 μ M]	0,5	0,2 μ M
AcoR [10 μ M]	0,5	0,2 μ M
GlaF [10 μ M]	1	0,4 μ M
GlaR [10 μ M]	1	0,4 μ M
TropF [10 μ M]	1	0,4 μ M
TropR [10 μ M]	1	0,4 μ M
Parfks1F [10 μ M]	1	0,4 μ M
Parfks1R [10 μ M]	1	0,4 μ M
polimeraza TaqNova [2U/ μ l]	0,5	0,04 U/ μ l
woda	7	-
matrycowe DNA*	1	-

* *C. albicans* [23 ng/ μ l], *C. glabrata* [26 ng/ μ l], *C. krusei* [31 ng/ μ l], *C. parapsilosis* [24 ng/ μ l], *C. tropicalis* [19 ng/ μ l], *Saccharomyces cerevisiae* [20 ng/ μ l], *Pichia pastoris* [19 ng/ μ l], *Serratia marcescens* [45 ng/ μ l], *Enterococcus faecium* [25 ng/ μ l], *Enterococcus faecalis* [26 ng/ μ l], *Klebsiella oxytoca* [58 ng/ μ l], *Staphylococcus aureus* [22 ng/ μ l], *Pseudomonas aeruginosa* [33 ng/ μ l], *Acinetobacter baumannii* [36 ng/ μ l], *Escherichia coli* [44 ng/ μ l], *Homo sapiens* [25 ng/ μ l].

Tabela 80 Profil temperaturowo-czasowy reakcji multipleks PCR do wykrywania 5 gatunków *Candida*.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
94	120	
94	30	
62	30	30
72	60	
72	180	

Przygotowałem sześć hodowli nocnych z pojedynczych kolonii: pięć oddzielnie dla każdego gatunku i jedną zawierającą wszystkie pięć klinicznie istotnych gatunków *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*). Hodowle prowadziłem według parametrów przedstawionych w rozdziale Materiały i metody [p. 3.15] Następnie z każdej hodowli płynnej wyizolowałem totalne DNA [Materiały i metody 3.16]. Przeprowadziłem reakcje złożonego PCR na matrycy genomowego DNA izolowanego z płynnych kultur drożdżowych zgodnie z warunkami przedstawionymi w tabelach nr 79 i 80. Wynik rozdzielu elektroforetycznego produktów amplifikacji przedstawiłem na rycinie nr 44.



Rycina 44 Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji reakcji multipleks PCR. M-marker wielkości 100-1000, 1-kontrola ujemna, 2-*C.parapsilosis*, 3-*C.albicans*, 4-*C. tropicalis*, 5-*C. krusei*, 6-*C. glabrata* 7-DNA izolowane z hodowli 5 wykrywanych gatunków *Candida*.

Otrzymany wynik potwierdza, iż poprawnie zoptymalizowałem reakcję multipleks PCR. Dla każdego z pięciu gatunków *Candida* otrzymałem specyficzny produkt o charakterystycznej długości. Nie zaobserwowałem powstawania produktów niespecyficznych. W przypadku DNA izolowanego z jednoczesnej hodowli pięciu gatunków dla każdego z nich otrzymałem specyficzny amplikon.

Sprawiłem również specyficzność układu multipleks PCR dla szczepów klinicznych oraz w stosunku do innych mikroorganizmów. Reakcje prowadziłem zgodnie z warunkami opisanymi w tabelach nr 79 i 80. Wyniki przedstawia tabela nr 81.

Tabela 81 Specyficzność układu multipleks PCR.

Gatunek	Produkt PCR [pz]
<i>C. albicans</i>	1128
<i>C. glabrata</i>	223
<i>C. krusei</i>	103
<i>C. parapsilosis</i>	195
<i>C. tropicalis</i>	384
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
<i>Pichia pastoris</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-
<i>Eterococcus faecalis</i>	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-
<i>Homo sapiens</i>	-

5.2.3. Podsumowanie i dyskusja wyników dotyczących układów diagnostycznych opartych o złożoną reakcję PCR

Celem tej części rozprawy doktorskiej było opracowanie nowej metody diagnostycznej opartej o reakcję złożonego PCR do diagnostyki zakażeń wywoływanych przez klinicznie istotne gatunki *Candida*, do których zaliczają się: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* oraz *C. tropicalis*. W pierwszej kolejności poszukiwałem nowych celów molekularnych i analizowałem sekwencje w celu znalezienia specyficznych gatunkowo sekwencji, na podstawie których zaprojektowałem startery do reakcji PCR. Na tym etapie zwracałem uwagę nie tylko na specyficzność projektowanych układów, ale również na wielkość produktów amplifikacji. Dobrałem długości amplikonów w taki sposób, aby można było je skutecznie rozdzielić za pomocą elektroforezy agarozowej i na tej podstawie zinterpretować wynik. Ponadto sekwencje starterów i wielkości amplifikowanych fragmentów muszą zapewniać wydajną amplifikację wszystkich celów molekularnych w mieszaninie reakcyjnej i dla jednego profilu temperaturowo-czasowego. W celu skutecznej realizacji zadań tego etapu badawczego opracowałem schemat postępowania tworzenia układu opartego o złożoną reakcję PCR (rycina nr 37).

W wyniku analiz teoretycznych wybrałem 3 geny w oparciu o sekwencje których zaprojektowałem specyficzne gatunkowo startery: gen akonitazy (dla *C. albicans*), gen enolazy (dla *C. krusei*), gen *trf4* (dla *C. glabrata* i *C. tropicalis*). Do identyfikacji *C. parapsilosis* wybrałem układ wykorzystujący gen *FKS1* opracowany w ramach prac badawczych prowadzonych w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Dla każdego z nowo zaprojektowanych układów przeprowadziłem proste reakcje PCR w celu ustalenia warunków amplifikacji (szczególnie temperatur przyłączania starterów) oraz weryfikacji specyficzności uzyskiwanych wyników. Pozytywne wyniki tego etapu pozwoliły na optymalizację warunków złożonej reakcji PCR, w której wszystkie pięć par starterów znajdowało się w jednej mieszaninie reakcyjnej. Do kluczowych parametrów optymalizacji należy zaliczyć stężenia poszczególnych starterów w mieszaninie reakcyjnej oraz temperaturę przyłączania starterów w reakcji PCR. Na podstawie rozdziału elektroforetycznego uzyskanych amplikonów możliwe było jednoznaczne określenie przynależności gatunkowej DNA drożdżaków w mieszaninie reakcyjnej. Wykazałem również, że w przypadku obecności DNA wszystkich badanych gatunków *Candida* uzyskuje się właściwe produkty amplifikacji specyficzne dla każdego z nich. Na podstawie pozytywnych wyników, które uzyskałem dla opracowanego układu diagnostycznego można stwierdzić, iż jego potencjał aplikacyjny umożliwia zastosowanie opracowanej

metodyki w procedurach diagnostycznych laboratoriów mikrobiologicznych (w tym klinicznych). Biorąc jednak pod uwagę konieczność rozdzielenia elektroforetycznego produktów jest to element, który ten potencjał może ograniczać. W związku z tym, w kolejnym obszarze badawczym realizowanym w ramach pracy doktorskiej podjąłem się zadania konstrukcji układu diagnostycznego wykorzystującego złożoną reakcję PCR, ale w czasie rzeczywistym. Jako podstawę do kolejnego zadania badawczego wykorzystałem wybrane na tym etapie cele molekularne.

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, iż:

- z powodzeniem zoptymalizowałem układ diagnostyczny oparty o reakcję złożonego PCR do jednoczesnej identyfikacji *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* oraz *C. tropicalis*,
- opracowana metoda umożliwia identyfikację przypadków zakażeń, w których występuje więcej niż jeden czynnik etiologiczny z grupy wykrywanych drożdżaków (tzw. infekcje mieszane),
- specyficzność opracowanej metody pozwala na jej wykorzystanie bez konieczności wcześniejszej izolacji czystych kultur drożdży,
- wykazałem po raz pierwszy, że gen akonitazy może być dobrym celem do specyficznej identyfikacji *C. albicans*.

5.3. Układ diagnostyczny do identyfikacji pięciu gatunków z rodzaju *Candida* w oparciu o reakcję *real-time* PCR.

Do zaprojektowania układu do identyfikacji gatunkowej drożdżaków z rodzaju *Candida* za pomocą *real-time* PCR wykorzystałem cele molekularne opracowane dla klasycznych reakcji PCR. Konieczna była jednak zmiana starterów do wykrywania *C. albicans*, gdyż produkt 1128 pz. jest zbyt długi do reakcji *real-time* PCR. Opracowałem nowy starter *reverse*, z zachowaniem zaprojektowanego wcześniej startera *forward* (AcoF) zastosowanego w układzie multipleks PCR. Zaprojektowałem również nowy układ do identyfikacji *C. parapsilosis*, z wykorzystaniem genu syntazy homocytrynianowej jako celu molekularnego. Analiza bioinformatyczna dla nowych układów została przedstawiona poniżej.

5.3.1. Analiza bioinformatyczna starterów do identyfikacji *C. albicans* i *C. parapsilosis* w reakcji *real-time* PCR

Zaprojektowane startery sprawdziłem pod kątem wzajemnych oddziaływań oraz możliwości tworzenia struktur drugorzędowych.

Analizę występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" oraz oddziaływań międzycząsteczkowych dla nowego startera oligonukleotydowego specyficznego dla *C. albicans* w układzie reakcji *real-time* PCR przedstawiają tabele nr 82-84.

Tabela 82 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla startera AcoReal.

Starter	Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Tm [°C]
AcoReal		-0,73	32,8

Tabela 83 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu selfdimer dla startera AcoReal.

Starter	Struktura	ΔG [kcal* mol^{-1}]	Liczba komplementarnych nukleotydów
AcoReal	<pre> 5' CCTCCTCTGACGGTCAAAAATACCTGC : : : : : : : 3' CGTCCATAAAACTGGCAGTCTCCTCC </pre>	-4,87	4
	<pre> 5' CCTCCTCTGACGGTCAAAAATACCTGC : : : : 3' CGTCCATAAAACTGGCAGTCTCCT </pre>	-4,41	3
	<pre> 5' CCTCCTCTGACGGTCAAAAATACCTGC : : 3' CGTCCATAAAACTGGCAGTCTCCTCC </pre>	-3,61	2

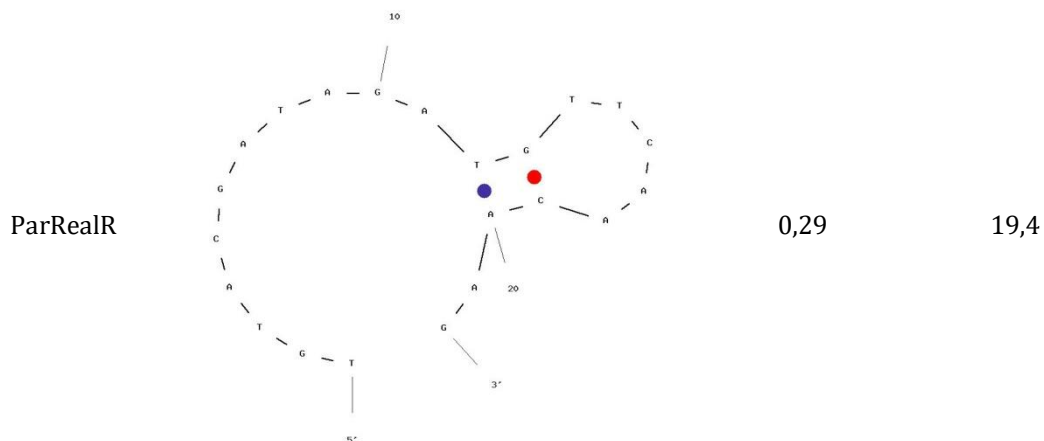


Tabela 86 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu selfdimer dla starterów ParRealF i ParRealR.

Starter	Struktura	ΔG [kcal*mol ⁻¹]	Liczba komplementarnych nukleotydów
	<pre> 5' GGGAAATAGAGATTCGTTTCTCCAG :::: 3' GACCTCTTTGCTTAGAGATAAGGG </pre>	-4,99	4
ParReal F	<pre> 5' GGGAAATAGAGATTCGTTTCTCCAG : :: :::: : 3' GACCTCTTTGCTTAGAGATAAGGG </pre>	-4,75	4
	<pre> 5' GGGAAATAGAGATTCGTTTCTCCAG : :: :: : :: 3' GACCTCTTTGCTTAGAGATAAGGG </pre>	-4,64	3
ParReal R	<pre> 5' TGTACGATAGATGTTCAACAAG :::: 3' GAACAACTTGTAGATAGCATGT </pre>	-5,24	4
	<pre> 5' TGTACGATAGATGTTCAA 3' GAACAACTTGTAGATAGCATGT </pre>	-3,65	4

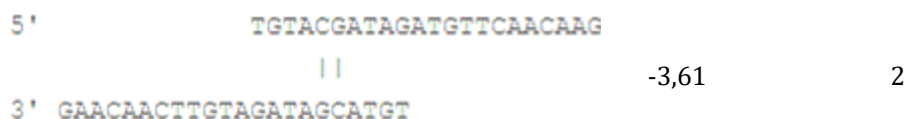


Tabela 87 Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami ParRealF i ParRealR.

Struktura	ΔG [kcal*mol ⁻¹]	Liczba komplementarnych nukleotydów
<pre> 5' TGTACGATAGATGTTCAACAAG : : 3' GACCTCTTTGCTTAGAGATAAGGG </pre>	-6,53	4
<pre> 5' TGTACGATAGATGTTCAACAAG :: : 3' GACCTCTTTGCTTAGAGATAAGGG </pre>	-3,52	3
<pre> 5' TGTACGATAGATGTTCAACAAG : : 3' GACCTCTTTGCTTAGAGATAAGGG </pre>	-3,29	3

W wyniku analizy bioinformatycznej nowo zaprojektowanych starterów do złożonej reakcji *real-time* PCR można stwierdzić, że żaden ze starterów nie tworzy stabilnych struktur typu "szpilki do włosów". Również oddziaływania między cząsteczkami tych samych starterów (homodimery) charakteryzowały się entalpią swobodną nieprzekraczającą wartości -5 kcal*mol⁻¹. Najwyższa wartość bezwzględna tego parametru wystąpiła w przypadku startera ParRealR i wyniosła 5,24 kcal*mol⁻¹. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że na końcu 3' występują dwa niesparowane nukleotydy to w połączeniu z nieznacznym przekroczeniem wartości 5 kcal*mol⁻¹ nie powinno to stanowić zagrożenia dla wydajnej amplifikacji. Badanie występowania oddziaływania pomiędzy cząsteczkami różnych starterów (heterodimery) wykazało dwie struktury, dla których swobodna entalpia wyniosła poniżej -6 kcal*mol⁻¹. Pierwsza z nich występuje pomiędzy starterami AcoF i AcoRealR (-6,24 kcal*mol⁻¹), a druga ParRealF i ParRealR (-6,53 kcal*mol⁻¹). W przypadku żadnej z tych struktur nie występuje wolny koniec 3' co uniemożliwia wydłużenie oligonukleotydów przez polimerazę DNA. Dzięki temu przeciwdziałanie ryzyku spadku wydajności amplifikacji w wyniku tego rodzaju

oddziaływań może być zrealizowane poprzez odpowiednio wysoką temperaturę przyłączania starterów, która wyeliminuje niespecyficzne oddziaływania.

5.3.2. Optymalizacja warunków dla układu diagnostycznego do identyfikacji pięciu klinicznie istotnych drożdżaków z rodzaju *Candida* z wykorzystaniem reakcji *real-time* PCR

Celem konstrukcji układu do identyfikacji gatunkowej drożdżaków z rodzaju *Candida* w oparciu o reakcję *real-time* PCR była możliwość jednoczesnego wykrywania wszystkich pięciu klinicznie znaczących gatunków w czasie jednej procedury diagnostycznej. Opierając się o wyniki otrzymane podczas optymalizacji multipleks PCR, przeprowadziłem amplifikację w układzie *real-time* PCR (tabele nr 88 i 89) dla każdego z badanych gatunków z osobna.

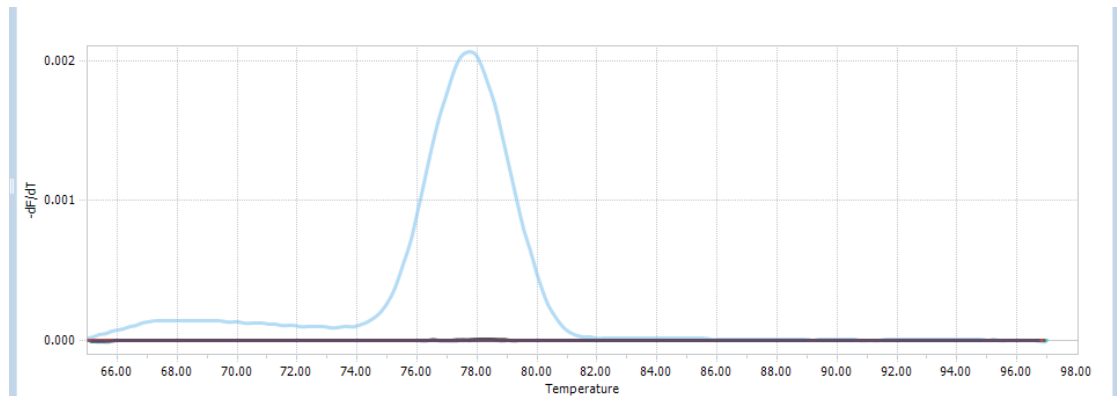
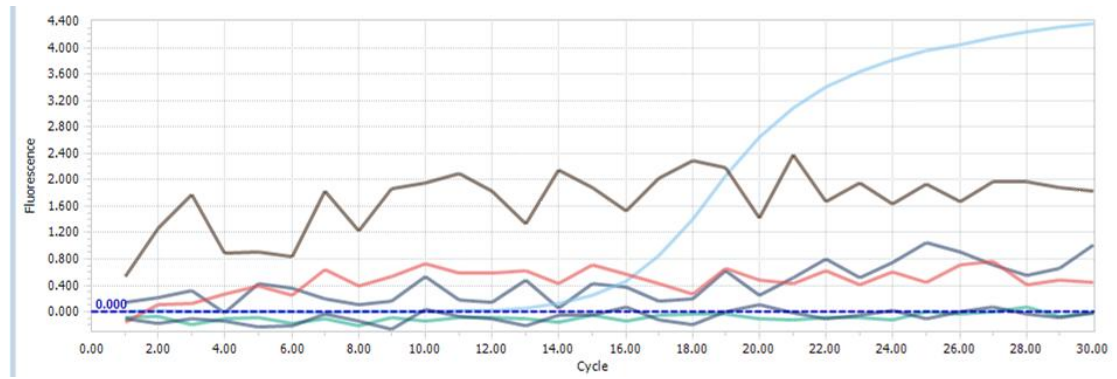
Tabela 88 Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do identyfikacji gatunkowej pięciu drożdżaków z rodzaju *Candida* za pomocą *real-time* PCR.

Odczynniki	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	12	-
MgCl ₂ [25mM]	2	2,5 mM
Starter forward [10μM]	1	0,5 μM
Starter reversed [10μM]	1	0,5 μM
Master SYBR Green 10x	2	1x
matrycowe DNA	2	-

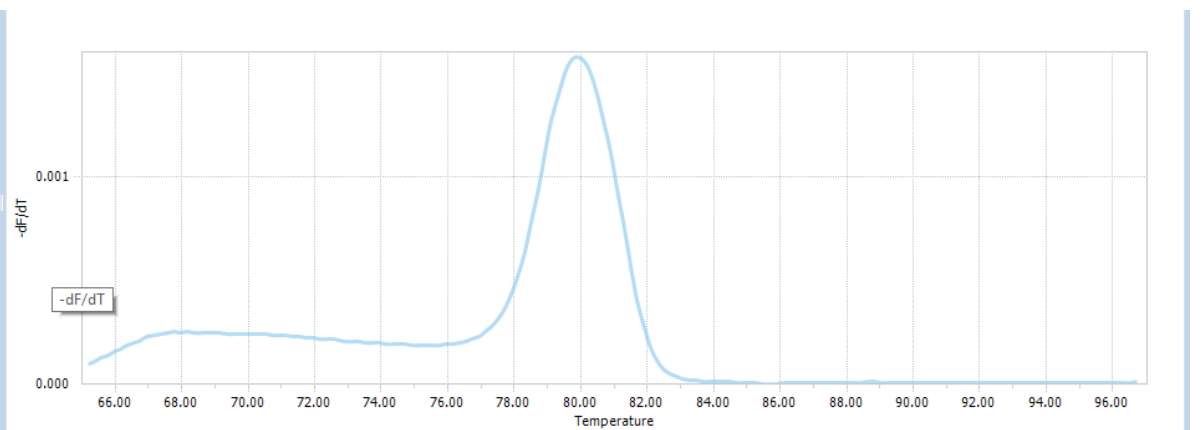
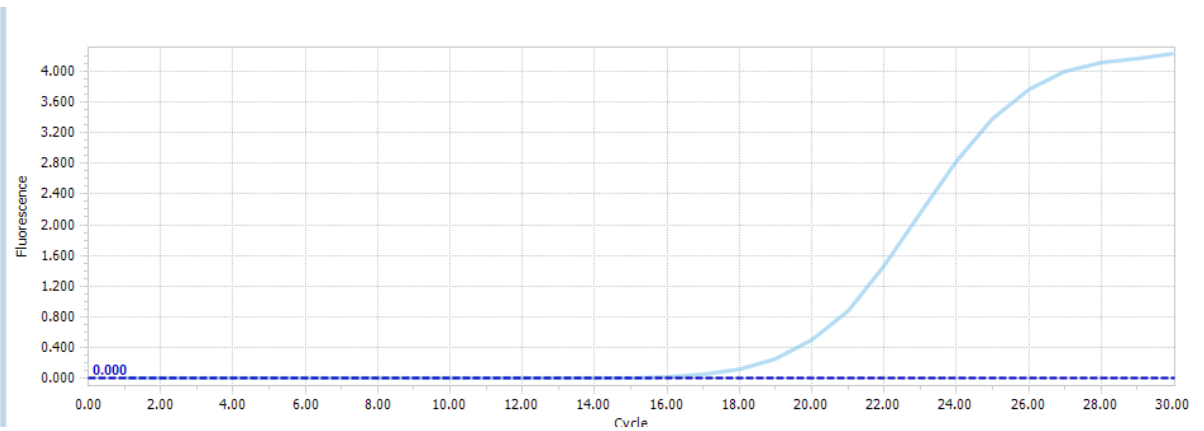
Tabela 89 Profil temperaturowo-czasowy reakcji *real-time* PCR do identyfikacji gatunkowej *Candida*.

Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
95	600	
95	10	
62	10	30
72	20	

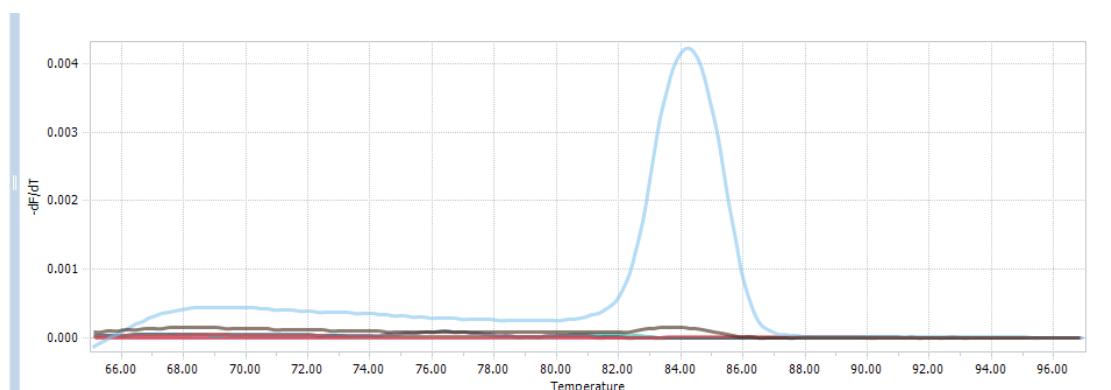
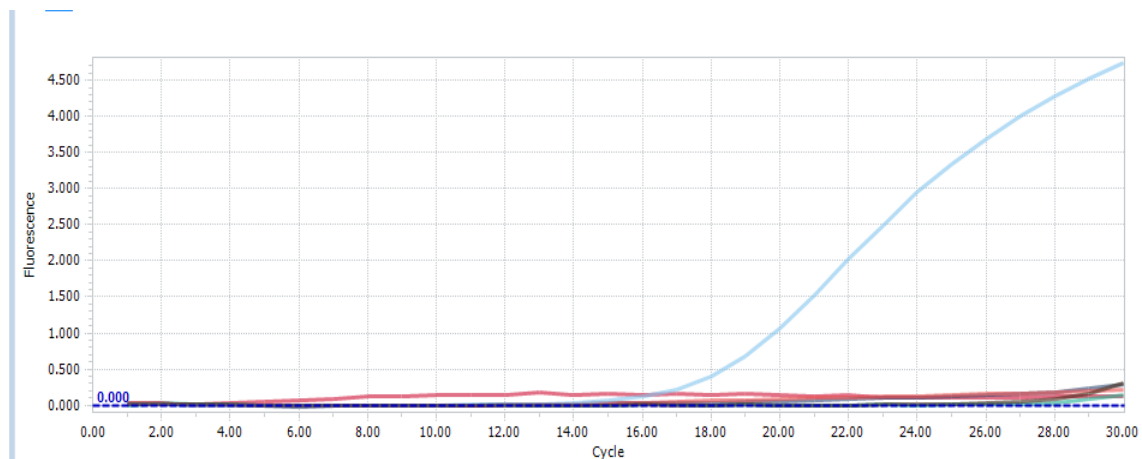
Matrycą w badanych układach były szczepy referencyjne *C. albicans* (ATCC90029), *C. parapsilosis* (ATCC22019), *C. krusei* (ATCC6258), *C. tropicalis* (ATCC750), *C. glabrata* (ATCC2001). Wyniki amplifikacji przedstawiają ryciny nr 45-49. Eksperymenty dla każdego gatunku przeprowadziłem w niezależnych reakcjach z jedną parą starterów specyficznych gatunkowo i jednoczesną amplifikacją z zastosowaniem uniwersalnego programu dla wszystkich matryc. W każdym eksperymencie przygotowałem kontrole negatywne.



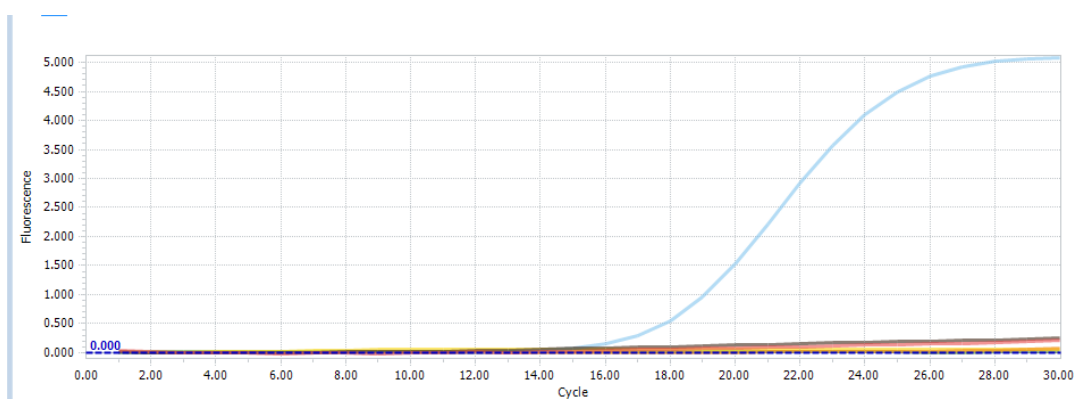
Rycina 45 Wynik amplifikacji w układzie *real-time* PCR oraz profil topnienia ampliconu dla *C. parapsilosis*.

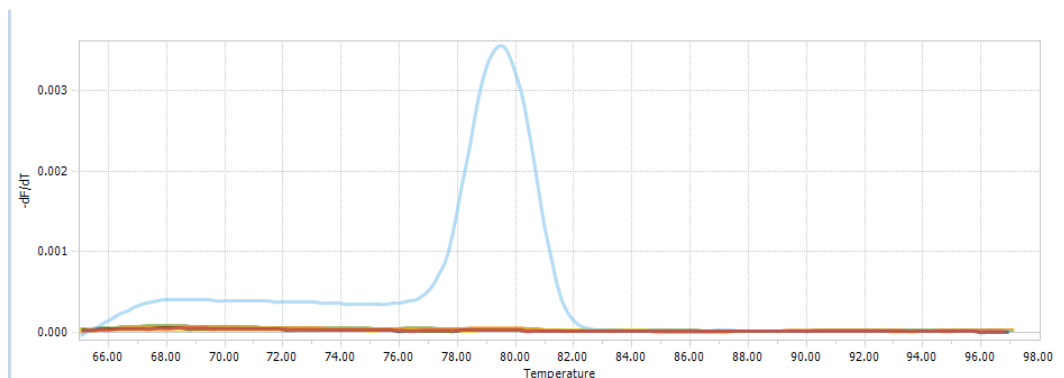


Rycina 46 Wynik amplifikacji w układzie *real-time* PCR oraz profil topnienia ampliconu dla *C. albicans*.

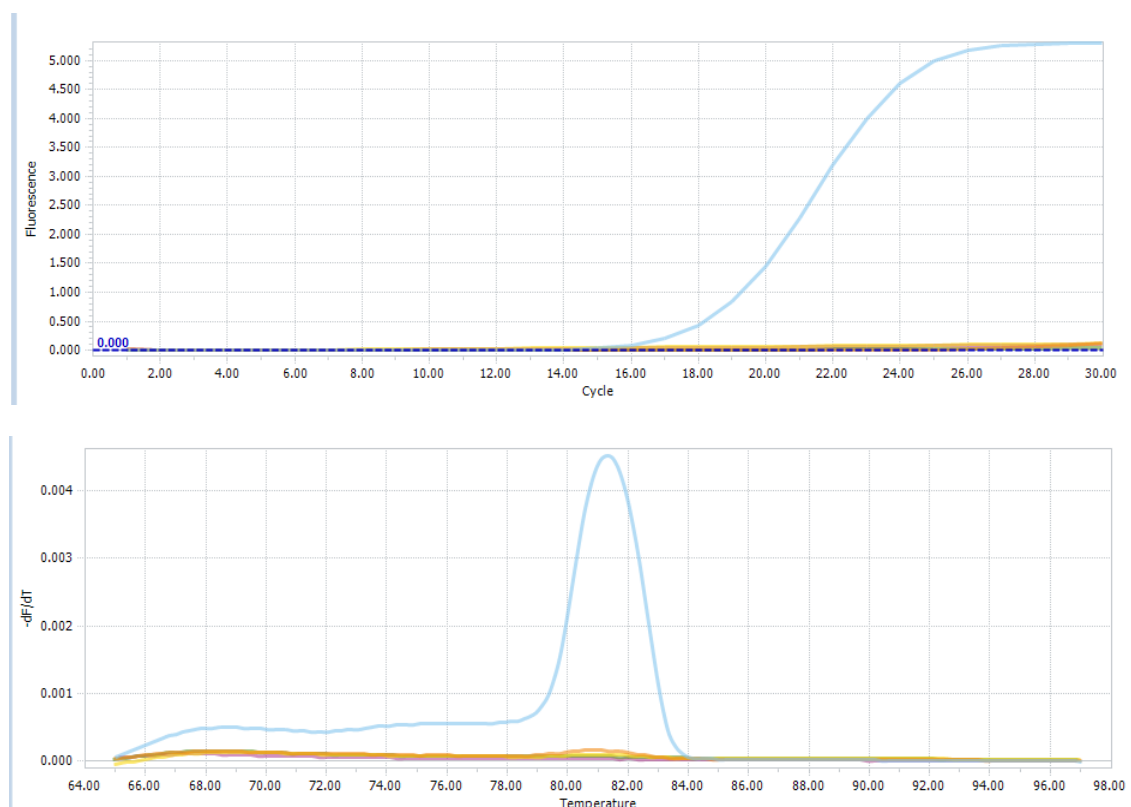


Rycina 47 Wynik amplifikacji w układzie *real-time* PCR oraz profil topnienia ampliconu dla *C. krusei*.





Rycina 48 Wynik amplifikacji w układzie *real-time* oraz profil topnienia amplikonu dla *C. glabrata*.



Rycina 49 Wynik amplifikacji w układzie *real-time* oraz profil topnienia amplikonu dla *C. tropicalis*.

Uzyskane wyniki potwierdziły poprawność ustalonych warunków reakcji oraz składów mieszanin reakcyjnych, ponieważ dla wszystkich gatunków otrzymałem specyficzną i wydajną amplifikację. Na podstawie otrzymanych wyników określiłem temperatury topnienia specyficznych amplikonów dla poszczególnych gatunków *Candida* (tabela nr 90)

Tabela 90 Temperatury topnienia amplikonów w reakcji real-time PCR dla poszczególnych gatunków *Candida*.

Gatunek	Temperatura topnienia amplikonu
	[°C]
<i>C. glabrata</i>	80
<i>C. parapsilosis</i>	78
<i>C. tropicalis</i>	80
<i>C. albicans</i>	80
<i>C. krusei</i>	83

5.3.3. Identyfikacja gatunkowa pięciu klinicznie istotnych drożdżaków z rodzaju *Candida* w oparciu o reakcję multipleks *real-time* PCR

Obecnie w molekularnej diagnostyce mikrobiologicznej coraz większe zastosowanie ma metoda *real-time* PCR. Jej podstawowymi zaletami jest bardzo wysoka czułość, szybkość oraz specyficzność. Ponadto wyniki otrzymywane są bezpośrednio po zakończeniu reakcji amplifikacji, bez konieczności dodatkowych analiz (np. elektroforezy). Umożliwia to automatyzację pracy laboratorium oraz tworzenie dedykowanego do testu oprogramowania, które po interpretacji przebiegu reakcji generuje wynik z badania. Ułatwia to pracę diagnostom laboratoryjnym oraz znacznie ułatwia proces wdrażania metody w laboratoriach.

Złożona reakcja *real-time* PCR łączy w sobie zalety reakcji multipleks oraz amplifikacji w czasie rzeczywistym. Dzięki niej można wykrywać więcej niż jeden cel molekularny w pojedynczej reakcji. W związku z tym, że detekcja amplikonów w reakcji *real-time* PCR odbywa się poprzez pomiar przyrostu fluorescencji, a nie rozdział elektroforetyczny produktów, dlatego w przypadku złożonej reakcji należy zapewnić takie warunki, aby możliwa była identyfikacja poszczególnych produktów amplifikacji. Stosując system detekcji oparty o niespecyficzne barwniki interkalujące analiza produktów reakcji amplifikacji odbywa się na podstawie krzywych topnienia amplikonów. Każdy z nich musi charakteryzować się inną i powtarzalną w obrębie danego gatunku wartością tego parametru. Drugim rozwiązaniem jest stosowanie specyficznych sond oligonukleotydowych wyznakowanych znacznikiem fluorescencyjnym. Sekwencja sondy jest specyficzna wobec fragmentu produktu reakcji PCR i w wyniku jej hybrydyzacji uzyskiwany jest sygnał fluorescencyjny. W przypadku stosowania kilku sond w jednej reakcji (wiele celów molekularnych do amplifikacji) każda z nich powinna być wyznakowana innym fluoroforem dzięki czemu możliwe jest przypisanie uzyskanego sygnału do poszczególnej sondy specyficznej wobec sekwencji amplifikowanej dla danego

patogenu. Drugie rozwiązanie jest znacznie droższe, dlatego w pracy skupiłem się na zastosowaniu zwykłych barwników fluorescencyjnych takich jak Sybr Green i różnicowanie gatunków w oparciu o różnice w profilu krzywych topnienia.

W reakcji multipleks *real-time* PCR wykorzystałem geny i odpowiednie dla nich sekwencje starterów zoptymalizowane w prostych reakcjach *real-time* PCR [4.3.2]. Po przeanalizowaniu temperatur topnienia specyficznych amplikonów w prostych reakcjach *real-time* PCR nie było możliwe zaprojektowanie reakcji typu pentapleks umożliwiającej amplifikację pięciu celów molekularnych w jednej reakcji PCR. Na podstawie analizy siły oddziaływań pomiędzy starterami oraz temperatur topnienia amplikonów wytypowałem kilka wariantów reakcji multipleks, które zweryfikowałem przeprowadzając odpowiednie reakcje PCR. Poniżej na rycinach nr 50-52 przedstawiłem uzyskane wyniki.

W przypadku wszystkich układów złożonej reakcji *real-time* PCR stosowałem wcześniej opracowany skład mieszanin reakcyjnych oraz profil temperaturowo-czasowy (tabele nr 88 i 89). Jedynym zmiennym parametrem było stężenie starterów użytych w reakcji PCR.

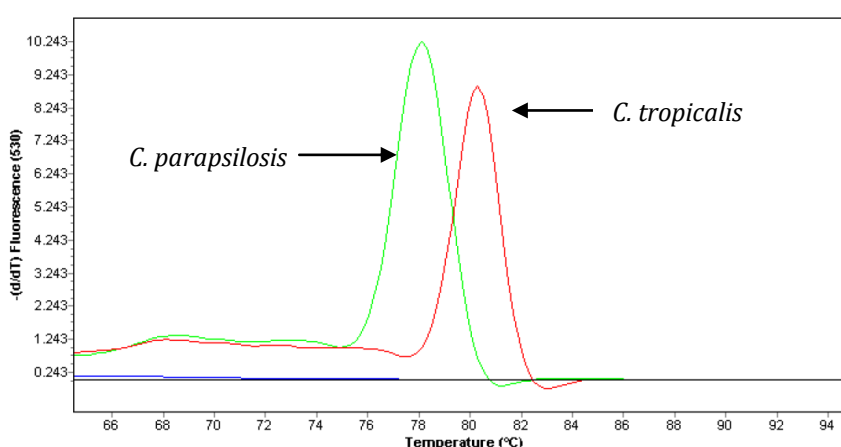
5.3.3.1. Reakcja *real-time* PCR typu dupleks do wykrywania *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*

Gatunki *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* są przedstawicielami należącymi do grupy *non-albicans Candida*. W przypadku zakażeń wywoływanych przez te drożdżaki stosuje się leczenie takie jak dla *C. albicans*. Niemniej jednak do celów epidemiologicznych oraz w przypadku nieskuteczności stosowanych leków informacja o przynależności gatunkowej może być bardzo istotna. Różnica w temperaturach topnienia amplikonów specyficznych dla *C. tropicalis* (T_m 80°C) oraz *C. parapsilosis* (T_m 78°C) wynosi 2 °C, co umożliwia ich jednoznaczną identyfikację w oparciu o analizę profilu topnienia produktów reakcji PCR. W tabeli nr 91 przedstawiłem stężenia użytych starterów w mieszaninie reakcyjnej. Wysoka wydajność amplifikacji dla matrycy DNA *C. parapsilosis* była otrzymywana przy dwukrotnie wyższym stężeniu starterów (była 0,4 μM) niż dla matrycy DNA *C. tropicalis* (0,2 μM).

Tabela 91 Stężenie starterów w reakcji typu dupleks real-time PCR do identyfikacji *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*

Wykrywany gatunek	Starter	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
<i>C. parapsilosis</i>	ParRealF	0,4 μ M
	ParRealR	0,4 μ M
<i>C. tropicalis</i>	TropF	0,2 μ M
	TropR	0,2 μ M

Na rycinie nr 50 przedstawiłem analizę krzywych topnienia dla powstałych amplikonów. Strzałkami podpisałem krzywe wskazując matryce DNA dodane do mieszaniny reakcyjnej.



Rycina 50 Analiza krzywych topnienia amplikonów powstałych w reakcji dupleks real-time PCR z wykorzystaniem starterów ParRealF, ParRealR, TropF oraz TropR.

Otrzymany wynik wskazuje na poprawną optymalizację reakcji dupleks *real-time* PCR do jednoczesnej identyfikacji gatunkowej *C. parapsilosis* oraz *C. tropicalis*. Dla każdego z badanych gatunków uzyskałem wydajną amplifikację, której specyficzność potwierdziła analiza krzywych topnienia. Wykazała ona występowanie specyficznych gatunkowo amplikonów o temperaturach topnienia zgodnych z wartościami wyznaczonymi przy pomocy pojedynczych reakcji *real-time* PCR.

5.3.3.2. Reakcja *real-time* PCR typu dupleks do wykrywania *C. albicans* i *C. krusei*

Odróżnienie *C. albicans* od *C. krusei* jako czynnika etiologicznego zakażenia ma kluczowe znaczenie do podjęcia leczenia, gdyż *C. krusei* wykazuje oporność na azole stosowane e pierwszej kolejności w przypadku infekcji spowodowanych przez drożdżaki.

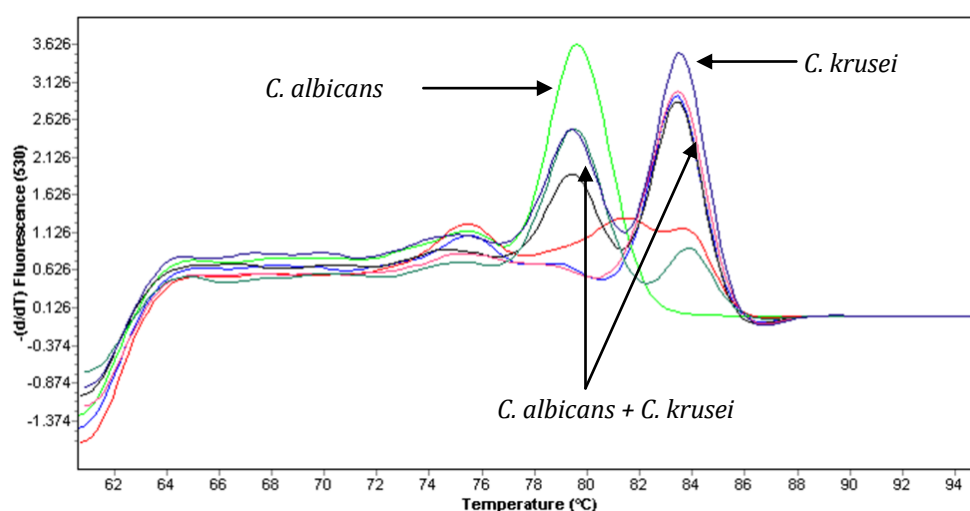
Różnica w temperaturach topnienia amplikonów specyficznych dla *C. albicans* (T_m 80°C) oraz *C. krusei* (T_m 83°C) wynosi 3 °C. Stosując dwukrotnie wyższe stężenie starterów dla *C. albicans* (0,4 μ M) niż dla *C. krusei* (0,2 μ M) uzyskałem wydajną

i specyficzną dla obu gatunków amplifikację. Stężenia starterów do reakcji dupleks *real-time* PCR przedstawia tabela nr 92.

Tabela 92 Stężenie starterów w reakcji dupleks *real-time* PCR do identyfikacji *C. albicans* i *C. krusei*

Wykrywany gatunek	Starter	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
<i>C. albicans</i>	AcoF	0,4 μ M
	AcoReal	0,4 μ M
<i>C. krusei</i>	EnoF	0,2 μ M
	EnoR	0,2 μ M

Na rycinie nr 51 zestawilem analizę krzywych topnienia dla powstałych amplikonów. Strzałkami podpisałem krzywe wskazując matryce DNA dodane do mieszaniny reakcyjnej. Przeprowadziłem również symulację zakażenia mieszanego lub kontaminacji *C. albicans* przy pobieraniu próbek (np. wymazu) dodając do jednej mieszaniny reakcyjnej DNA dwóch gatunków *Candida*.



Rycina 51 Analiza krzywych topnienia amplikonów powstałych w reakcji dupleks *real-time* PCR z wykorzystaniem starterów AcoF, AcoReal, EnoF oraz EnoR.

Uzyskałem pozytywne wyniki amplifikacji dla każdego z badanych gatunków. W przypadku próbki, w której znajdowało się DNA obu gatunków drożdżaków analiza krzywych topnienia wykazała występowanie dwóch amplikonów o różnych temperaturach topnienia. Maksima tych krzywych odpowiadały temperaturom topnienia otrzymanym dla poszczególnych gatunków oddzielnie co potwierdza możliwość wykrywania zakażeń mieszanych wywoływanych przez te drożdżaki.

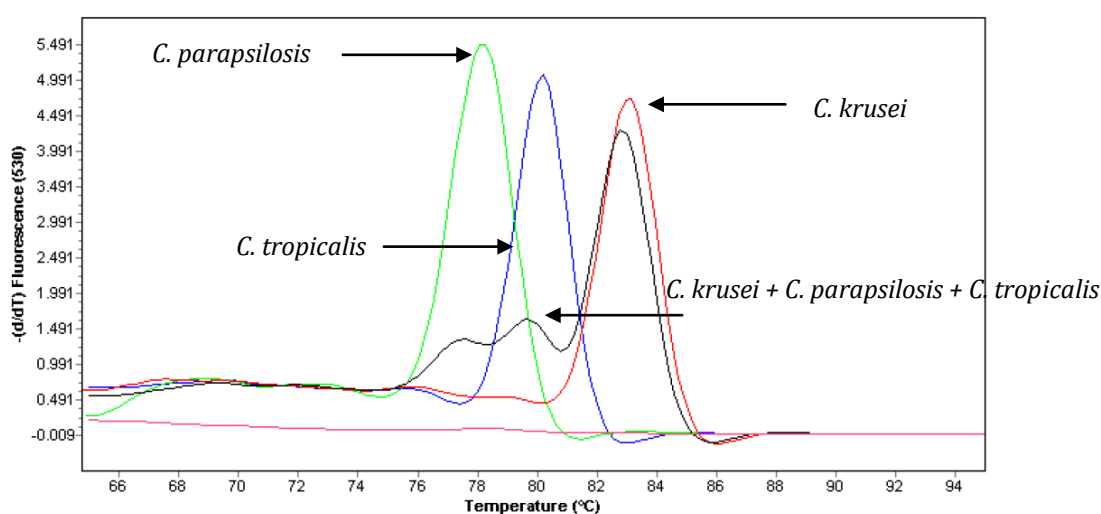
5.3.3.3. Reakcja *real-time* PCR typu tripleks do wykrywania *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *C. krusei*

Na podstawie analizy wartości temperatur poszczególnych gatunkowo specyficznych amplikonów (tabela nr 90) zaprojektowałem układ tripleks *real-time* PCR do jednoczesnej identyfikacji trzech gatunków drożdżaków *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *C. krusei*. Jest to maksymalna ilość produktów PCR do zidentyfikowania na podstawie analizy temperatur topnienia dla układów opracowanych w prostych reakcjach *real-time* PCR. Wynika to z faktu, że dla trzech gatunków temperatura topnienia amplikonów jest identyczna i wynosi 80°C (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*). Stężenia stosowanych starterów oligonukleotydowych przedstawia tabela nr 93.

Tabela 93 Stężenie starterów w reakcji tripleks *real-time* PCR do wykrywania *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *C. krusei*

Wykrywany gatunek	Starter	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
<i>C. tropicalis</i>	TropF	0,4 μM
	TropR	0,4 μM
<i>C. parapsilosis</i>	ParRealF	0,4 μM
	ParRealR	0,4 μM
<i>C. krusei</i>	EnoF	0,2 μM
	EnoR	0,2 μM

Rycina nr 52 przedstawia analizę profili topnienia dla uzyskanych amplikonów. Strzałkami podpisano krzywe wskazując matryce DNA dodane do mieszaniny reakcyjnej. Przeprowadziłem cztery niezależne reakcje, do trzech dodałem DNA poszczególnych gatunków *Candida* oddzielnie, natomiast do trzeciej DNA wszystkich trzech identyfikowanych gatunków drożdżaków.



Rycina 52 Analiza krzywych topnienia amplikonów powstałych w reakcji tripleks *real-time* PCR z wykorzystaniem starterów TropF, TropR, ParRealF, ParRealR, EnoF oraz EnoR.

Otrzymany wynik wskazuje na wydajną i specyficzną amplifikację w przypadku reakcji, gdzie w mieszaninie reakcyjnej znajdowało się DNA tylko jednego z badanych gatunków. Zaobserwowałem znaczący spadek wydajności amplifikacji dla trzech celów molekularnych jednocześnie (obecność w mieszaninie reakcyjnej DNA wszystkich trzech gatunków *Candida*). Mogło to być spowodowane tym, że stosowany master mix nie był dostosowany do reakcji multipleks i nie zapewniał odpowiedniej ilości nukleotydów oraz polimerazy. Innym powodem może być preferencja reakcji amplifikacji w kierunku jednego z produktów. Rozwiązaniem może być dokładna optymalizacja układów.

5.3.4. Podsumowanie i dyskusja wyników dotyczących układów diagnostycznych opartych o metodę *real-time* PCR

Na podstawie wyników uzyskanych we wcześniejszych etapach badań w ramach realizacji pracy doktorskiej zaprojektowałem układy do wykrywania pięciu klinicznie istotnych gatunków *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) za pomocą reakcji *real-time* PCR. Po przeprowadzeniu analiz teoretycznych sekwencji starterów oraz optymalizacji reakcji amplifikacji pod kątem stężenia starterów oligonukleotydowych wykazałem, że opracowane układy zapewniają wydajną i specyficzną amplifikację. Potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników jest bardzo wysoki ponieważ technika *real-time* PCR jest powszechnie stosowana w klinicznej diagnostyce molekularnej.

Opracowałem również układy złożonych reakcji *real-time* PCR w wyniku, których możliwa jest amplifikacja więcej niż jednego celu molekularnego w mieszaninie reakcyjnej. Skutkuje to tym, że za pomocą jednej reakcji można przeprowadzić jednoczesną identyfikację kilku gatunków drożdżaków. W związku z tym, że jako system detekcji zastosowałem barwnik fluorescencyjny Sybr Green, konieczna była weryfikacja powstałych produktów poprzez przeprowadzenie analizy krzywej topnienia i wyznaczenie dla każdego z amplikonów charakterystycznych temperatur topnienia. Ograniczeniem w tworzeniu różnych wariantów układów diagnostycznych (kombinacji wykrywanych gatunków) jest właśnie ten parametr. Należy dobrać taki zestaw starterów, aby temperatury topnienia specyficznych gatunkowo produktów nie nakładały się na siebie. Ograniczenie to może zostać zniesione poprzez zastosowanie sond oligonukleotydowych wyznakowanych różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. Wzrost fluorescencji dla określonego kanału detekcji odpowiadającemu danemu fluoroforowi wskazuje na obecność specyficznego gatunkowo produktu. Tego rodzaju podejście zdecydowanie upraszcza interpretację wyników amplifikacji, ponieważ już uzyskanie

pozytywnego sygnału w reakcji świadczy o obecności danego gatunku *Candida*. Sondy molekularne są rozwiązaniem droższym od barwników interkalujących. Wymagają one również dodatkowego etapu projektowania co wydłuża czas opracowania metody. W końcowym rezultacie jednak, w przypadku stosowania w procedurze laboratoryjnej koszty jednostkowe analizy są stosunkowo niskie co w połączeniu z szybkim i jednoznacznym wynikiem czyni je doskonałym narzędziem diagnostycznym.

5.4. Walidacja opracowanych układów diagnostycznych na szczepach izolowanych z próbek klinicznych

Wszystkie dotychczas opisane metody do identyfikacji klinicznie znaczących drożdżaków z rodzaju *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*) zweryfikowałem pod kątem specyficzności i poprawności uzyskiwanych wyników na szczepach referencyjnych. W celu wykazania potencjału aplikacyjnego opracowanych układów diagnostycznych niezbędna była ich walidacja z wykorzystaniem szczepów pochodzących z próbek klinicznych.

Ta część pracy jest wynikiem 3 miesięcznego stażu odbytego w Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Próbkę od pacjentów pobierane były w wyniku rutynowych badań i poddawane identyfikacji według procedur obowiązujących w laboratorium. Do walidacji opracowanych przeze mnie metod wykorzystywałem wyizolowane czyste kultury otrzymywane na podłożu chromogennym ChromAgarCandida lub podłożu Sabourouda [3.15]. W zależności od materiału klinicznego i zastosowanej procedury diagnostycznej szczepy identyfikowane były tylko do rodzaju lub przypisywane do poziomu gatunku.

5.4.1. Identyfikacja szczepów w laboratorium klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku

Materiał kliniczny skierowany do identyfikacji w kierunku drożdżaków posiewany był na podłoża Sabourouda i agar tryptozowo-sojowy. Na podstawie morfologii przypisywany był do rodzaju *Candida*. Identyfikacja gatunkowa realizowana była poprzez posiew na podłoża chromogenne, materiały kliniczne o wysokiej wartości diagnostycznej lub z zaleceniami identyfikacji gatunkowej poddawane były analizie za pomocą testów API lub systemu VITEK z panelem identyfikacyjnym w kierunku drożdżaków. W trakcie odbywania stażu w laboratorium zidentyfikowane były cztery pozytywne próbki krwi. Procedurę postępowania w kierunku identyfikacji gatunkowej drożdżaków z rodzaju *Candida* przedstawiłem na rycinie nr 53.



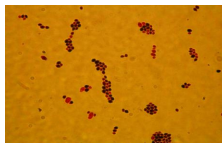
Pobranie 10 ml próbki krwi od pacjenta



Posiew na odpowiednie podłoże płynne w butelce do aparatu BactAlert



Inkubacja w aparacie BactAlert



Barwienie Grama

Inny materiał kliniczny



Posiew na podłoża Saobourauda, tryptosowo sojowe, chromogenne





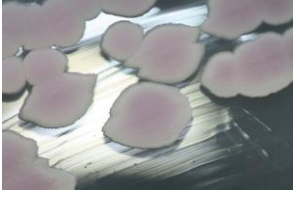


Identyfikacja gatunkowa za pomocą testów API lub systemu VITEK



Rycina 53 Schemat procedury diagnostycznej identyfikacji gatunkowej pozytywnych posiewów krwi oraz innych materiałów klinicznych

Wyniki uzyskiwane na podłożu chromogennym przedstawiłem w tabeli nr 94.

Tabela 94 Wyniki hodowli na podłożach chromogennych w kierunku identyfikacji gatunkowej *Candida*.

Gatunek	Powierzchnia kolonii	Brzeg kolonii	Zdjęcie
<i>C. albicans</i>	Gładka, błyszcząca	Gładki	
<i>C. glabrata</i>	Gładka, błyszcząca	Gładki	
<i>C. krusei</i>	Szorstka, matowa	nieregularny	
<i>C. tropicalis</i>	Gładka, błyszcząca	Gładki	
<i>Candida</i> spp.	Gładka/szorstka/ błyszcząca matowa	Gładki/ nieregularny	

W przypadku próbek, co do których konieczne było bezbłędne określenie przynależności gatunkowej *Candida* przeprowadzany był test biochemiczny w aparacie VITEK®2. Do tego celu wykorzystywana była karta diagnostyczna Vitek® 2 YST ID. Przykładowy wynik takiego testu przedstawiają ryciny nr 54 i 55.

Identification Information	Card: YST	Lot Number: 243354310	Expires: Aug 26, 2016 13:00 CEST
	Completed: Jun 24, 2015 08:03 CEST	Status: Final	Analysis Time: 18.25 hours
Selected Organism	99% Probability Bionumber: 4000104000200110	Candida glabrata	Confidence: Excellent identification
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			

Rycina 54 Wynik identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju *Candida* (*C. glabrata*) - karta Vitek® 2 YST ID/ Vitek®2 compact (bioMérieux) [zdj. własne].

03	LysA	04	PELta	05	LeuA	07	ARG	10	ERYa	12	GLYLa	13	TyrA	14	BNAG	15	ARBa
18	ARMa	19	GGALa	20	GENa	21	dGLLta	23	LACa	24	MMGCa	26	dCELLa	27	GGI	28	dMALa
29	dRAFa	30	NAGA1	32	dPNEa	33	dMELa	34	dMZa	38	SSEa	39	RhAa	40	MLTa	42	dSORa
44	SACa	45	URE	46	AGLU	47	dTURa	48	dPREa	49	NO3a	51	WAPa	52	dGATa	53	ESC
54	dGLTa	55	dDVLa	56	LATa	58	ACEa	59	CITa	60	GRTa	61	PRIOa	62	2dGa	63	NAGa
64	dGNTa																

Rycina 55 Wynik identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju *Candida* (*C. glabrata*) - karta Vitek® 2 YST ID/ Vitek®2 compact (bioMérieux) [zdj. własne].

Na podstawie opisanych powyżej testów szczepy izolowane z próbek klinicznych zostały zidentyfikowane do poziomu rodzaju lub gatunku przez personel Laboratorium Mikrobiologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego. Otrzymane w ten sposób wyniki posłużyły mi do walidacji metod będących wynikiem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej. Wykorzystując pojedyncze kolonie wyizolowane z czystych kultur z badanych materiałów klinicznych zakładałem i prowadziłem hodowle drożdżaków zgodnie z procedurą opisaną w materiałach i metodach [3.15]. Następnie przeprowadziłem izolację DNA [3.16]. Oczyszczone DNA stanowiło matryce do przeprowadzenia identyfikacji gatunkowej za pomocą opracowanych metod. Identyfikację przeprowadziłem dla 4 opracowanych układów wg warunków opisanych w rozdziale "Materiały i metody":

- tRFLP [3.21]
- *real-time* PCR pan-*Candida* [3.20]
- multipleks PCR [3.22]
- gatunkowo specyficzny *real-time* PCR [3.23]

Wyniki przedstawiłem w tabeli nr 95.

Tabela 95 Wynik identyfikacji drożdżaków izolowanych z materiałów klinicznych za pomocą opracowanych układów diagnostycznych

lp	Materiał kliniczny	Wynik laboratorium	t-RFLP	real-time pan-Candida	multipleks PCR	real-time PCR
1	źółć	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2	gardło-wymaz	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
3	mocz	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4	kanal szyjki macicy - wymaz	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
5	aspirat z oskrzeli	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
6	mocz	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
7	mocz	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
8	gardło-wymaz	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
9	treść z rurki intubacyjnej	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
10	gardło-wymaz	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
11	mocz	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
12	mocz	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
13	mocz	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
14	mocz	<i>Candida sp.</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
15	mocz	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	+	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
16	plwocina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
17	kał	<i>Candida sp.</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
18	płyn z jamy otrzewnej	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
19	odbyt-wymaz	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
20	krew	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
21	pochwa - wymaz	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-



22	aspirat z oskrzeli	Candida sp.	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
23	kanał szyjki macicy - wymaz	Candida sp.	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
24	mocz	C. glabrata	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
25	mocz	Candida sp.	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
26	treść z rurki intubacyjnej	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
27	treść z rurki intubacyjnej	C. krusei	<i>C. krusei</i>	+	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
28	kanał szyjki macicy - wymaz	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
29	odbyt-wymaz	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
30	odbyt-wymaz	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
31	mocz	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
32	aspirat z oskrzeli	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
33	plwocina	C. tropicalis	<i>C. tropicalis</i>	+	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
34	nos-wymaz	Candida sp.	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
35	treść z rurki intubacyjnej	Candida sp.	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
36	kał	C. krusei	<i>C. krusei</i>	+	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
37	kał	Candida sp.	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
38	plwocina	Candida sp.	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
39	mocz	C. glabrata	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
40	kał	C. tropicalis	<i>C. tropicalis</i>	+	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
41	odbyt-wymaz	Candida sp.	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
42	gardło-wymaz	Candida sp.	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
43	treść z rurki intubacyjnej	Candida sp.	<i>C. parapsilosis</i>	+	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
44	popłuczyny oskrzelowe (BAL)100 000 cfu/ml	Candida sp.	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>



45	kał	Candida sp.	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
46	krew	C. krusei	<i>C. krusei</i>	+	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
47	popłuczyny oskrzelowe (BAL)	C. glabrata	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
48	aspirat z oskrzeli	C. glabrata	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
49	plwocina	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
50	plwocina	C. glabrata	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
51	mocz	C. kefyr	?	+	-	-
52	mocz	C. krusei	<i>C. krusei</i>	+	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
53	gardło-wymaz	C. glabrata	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
54	plwocina	C. krusei	<i>C. krusei</i>	+	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
55	plwocina	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
56	jama ustna	Candida sp.	<i>C. krusei</i>	+	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
57	mocz	Candida sp.	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
58	mocz	C. krusei	<i>C. krusei</i>	+	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
59	kał	Candida sp.	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
60	kanał szyjki macicy – wymaz	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
61	mocz	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
62	kanał szyjki macicy – wymaz	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
63	kał	Candida sp.	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
64	krew	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
65	mocz	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
66	gardło-wymaz	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
67	odbyt-wymaz	Candida sp.	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
68	kał	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
69	plwocina	C. albicans	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

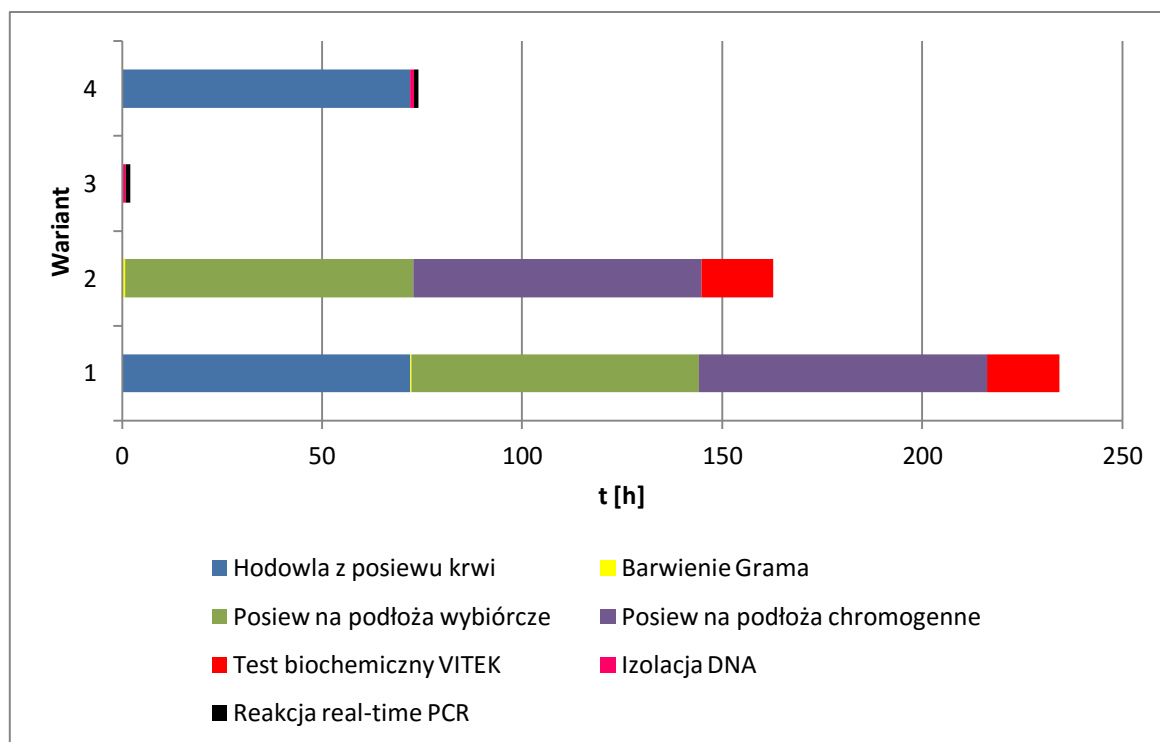


70	plwocina	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	+	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
71	aspirat z oskrzeli	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
72	kał	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
73	plwocina	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
74	pochwa - wymaz	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
75	gardło-wymaz	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
76	kał	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
77	kał	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
78	kał	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
79	kał	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
80	kał	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
81	kał	<i>Candida sp.</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
82	mocz	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
83	aspirat z oskrzeli	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
84	gardło-wymaz	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
85	krw	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
86	mocz	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
87	mocz	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
88	kał	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
89	treść z rurki intubacyjnej	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
90	treść z rurki intubacyjnej	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
91	treść z rurki intubacyjnej	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
92	popłuczyny oskrzelowe (BAL)	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
93	popłuczyny oskrzelowe (BAL)	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	+	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
94	plwocina	<i>Candida sp.</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>



95	aspirat z oskrzeli	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
96	ropień - treść	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
97	odbyt-wymaz	<i>C. norvegensis</i>	?	+	-	-
98	odbyt-wymaz	<i>Candida sp.</i>	<i>C. tropicalis</i>	+	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
99	odbyt-wymaz	<i>Candida sp.</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
100	odbyt-wymaz	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
101	odbyt-wymaz	<i>Candida sp.</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
102	popłuczyny oskrzelowe (BAL)	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
103	popłuczyny oskrzelowe (BAL)	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
104	plwocina	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	+	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>

Otrzymane rezultaty potwierdziły poprawność uzyskiwanych wyników diagnostycznych z zastosowanie opracowanych układów. W przypadku wszystkich próbek otrzymałem wyniki zgodne z założonymi dla poszczególnych metod. Wstępna walidacja układów diagnostycznych będących wynikiem badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej wskazuje na możliwość ich zastosowania w rutynowych procedurach prowadzonych w laboratoriach mikrobiologicznych, co determinuje wysoki potencjał aplikacyjny wyników badań. Zastosowanie metod molekularnych znacznie skraca czas diagnostyki w porównaniu z metodami opartymi o analizę biochemiczną. Porównując je natomiast do identyfikacji na podstawie morfologii kolonii na podłożach chromogennych to dodatkowo charakteryzują się dużo wyższą specyficnością i jednoznacznością wyników. Przykładowe warianty zastosowania opracowanej metody diagnostycznej opartej o reakcję *real-time* PCR w procedurze laboratoryjnej przedstawia rycina nr 56.



Rycina 56 Czas identyfikacji gatunkowej drożdżaków z rodzaju *Candida* w 4 wariantach procedur diagnostycznych

- 1- Rutynowa procedura stosowana w laboratorium Mikrobiologii Klinicznej w przypadku próbek krwi.
- 2- Rutynowa procedura stosowana w laboratorium Mikrobiologii Klinicznej w przypadku pozostałych materiałów klinicznych.
- 3- Proponowana procedura z zastosowaniem opracowanej metody *real-time* PCR (w przypadku próbek krwi bez etapu hodowli).
- 4- Proponowana procedura z zastosowaniem metody *real-time* PCR po otrzymaniu pozytywnego wyniku posiewu krwi.

Porównanie czasu diagnostyki w obrębie procedur przedstawionych na rycinie nr 56 jednoznacznie wskazuje na przewagę stosowania metod molekularnych (w tym przypadku *real-time* PCR). Pozwala to na drastyczne skrócenie czasu oczekiwania na wynik identyfikacji dla próbek krwi z blisko 250 do 2 godzin w przypadku izolacji DNA bez etapu hodowli lub 74 godzin jeżeli analizie poddawana byłaby próbka pochodząca z pozytywnego wyniku posiewu krwi. Zatem stosując opracowaną metodę diagnostyczną nawet po uzyskaniu informacji o obecności drobnoustrojów we krwi pacjenta i wybarwieniu preparatu metodą Grama w celu wykrycia komórek drożdży następuje ponad 3-krotne skrócenie czasu identyfikacji gatunkowej. Znajduje to bezpośrednie przełożenie na szybkość wdrożenia poprawnego leczenia i w konsekwencji większe prawdopodobieństwo przeżycia. W przypadku badania innych próbek klinicznych również zauważalna jest drastyczna przewaga metody *real-time* PCR. Wdrożenie opracowanej metody jest w stanie skrócić czas identyfikacji gatunkowej z ponad 150 do 2 godzin. Biorąc pod uwagę poprawność identyfikacji gatunkowej przeprowadzonej z wykorzystaniem opracowanych metod molekularnych oraz znaczącą przewagę w czasie analizy można stwierdzić, że ich wdrożenie w laboratorium klinicznym skutkowałoby możliwością jak najszybszego podjęcia skutecznego leczenia. Efektem takiego postępowania byłoby skrócenie czasu pobytu pacjenta w szpitalu, obniżenie kosztów leczenia oraz prawdopodobieństwa pojawiania się lekoopornych szczepów. Biorąc pod uwagę długofalowe korzyści oraz bezpośrednie przełożenie ekonomiczne wyższy jednostkowy koszt badania z wykorzystaniem metod molekularnych w porównaniu z metodami klasycznymi zostanie zniwelowany przez oszczędności związane z leczeniem pacjenta oraz obniży wskaźnik śmiertelności.

5.5. Przeciwdziałanie inhibicji reakcji PCR w reakcjach diagnostycznych

Stosowanie metod molekularnych (w szczególności opartych na reakcjach enzymatycznych jak np. PCR) w diagnostyce klinicznej wymaga dokładnego oczyszczenia DNA z materiałów badawczych. Jest to konieczne ze względu na obecność licznych inhibitorów reakcji enzymatycznych w próbkach klinicznych. Niesie to ze sobą niebezpieczeństwo uzyskiwania wyników fałszywie negatywnych. Dodatkowy etap ekstrakcji kwasów nukleinowych nie tylko wydłuża procedurę diagnostyczną, ale również podnosi jej koszt. Takie podejście często też wymaga zatrudnienia odpowiednio przeszkolonego personelu, gdyż poprawne przeprowadzenie etapu izolacji DNA jest kluczowe dla wiarygodności otrzymanych wyników. Wszelkiego rodzaju kontaminacje prowadzą do błędnych wyników. Stosowanie zamkniętych systemów do izolacji kwasów nukleinowych wymaga zakupienia drogiego sprzętu oraz

zwiększa jednostkowy koszt wykonania badania wynikający z konieczności zakupu dodatkowych odczynników. Nigdy również nie można mieć pewności co do całkowitego usunięcia inhibitorów z badanej próbki. Dlatego w celu zwiększenia potencjału aplikacyjnego metod diagnostycznych opartych o amplifikację kwasów nukleinowych prowadzone są liczne badania nad możliwością przeprowadzania reakcji PCR bezpośrednio z próbek klinicznych bez etapu oczyszczania kwasów nukleinowych. Jednym ze stosowanych rozwiązań jest mutageneza polimeraz DNA w celu obniżenia ich wrażliwości na inhibitory. Szczególnie problematycznymi, a z drugiej strony wartościowymi diagnostycznie są próbki krwi.

W związku z tym, że wśród materiałów klinicznych były cztery pozytywne pod względem *Candida* sp. kultury krwi, postanowiłem opracować warunki reakcji umożliwiające zastosowanie metod molekularnych opartych o PCR do wykrywania drożdżaków bez obawy wystąpienia wyników fałszywie negatywnych wynikających z inhibicji polimerazy. W tym celu postanowiłem zbadać komercyjnie dostępną polimerazę o zwiększonej odporności na inhibitory występujące we krwi. Polimeraza OmniKlenTaq (DNA Polymerase Technology) jest fragmentem Klenowa polimerazy Taq z mutacjami, które według wynalazców umożliwiają wydajną amplifikację nawet przy 20% krwi pełnej w badanej próbce (Kermekchiew i in. 2009). Jako układ do weryfikacji właściwości polimerazy wybrałem amplifikację fragmentu genu 18S rDNA. W pierwszej kolejności przeprowadziłem amplifikację w gradiencie stężenia krwi pełnej w próbce. W związku z tym, że producent nie podaje jednostkowości polimerazy zastosowałem rekomendowaną objętość. Skład mieszanin reakcyjnych oraz profil temperaturowo czasowy reakcji przedstawiają tabele nr 96 i 97.

Tabela 96 Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA.

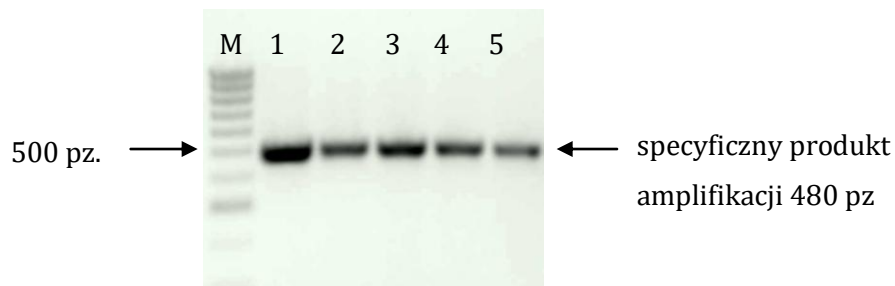
Odczynniki	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	Do 25	-
10x OmniKlen bufor	2,5	1x
Starter 18SF [10μM]	1	0,5 μM
Starter 18SR [10μM]	1	0,5 μM
dNTPs [8mM]	2	0,64 mM
DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 [23 ng/μl]	2	1,84 ng/μl
Polimeraza OmniKlenTaq	0,25	-
Krew pełna	0-10*	0-40%

*zakres stosowanych objętości krwi pełnej dodawanej do mieszaniny reakcyjnej od 0 do 10 μl.

Tabela 97 Profil temperaturowo-czasowy reakcji Real-time PCR do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA.

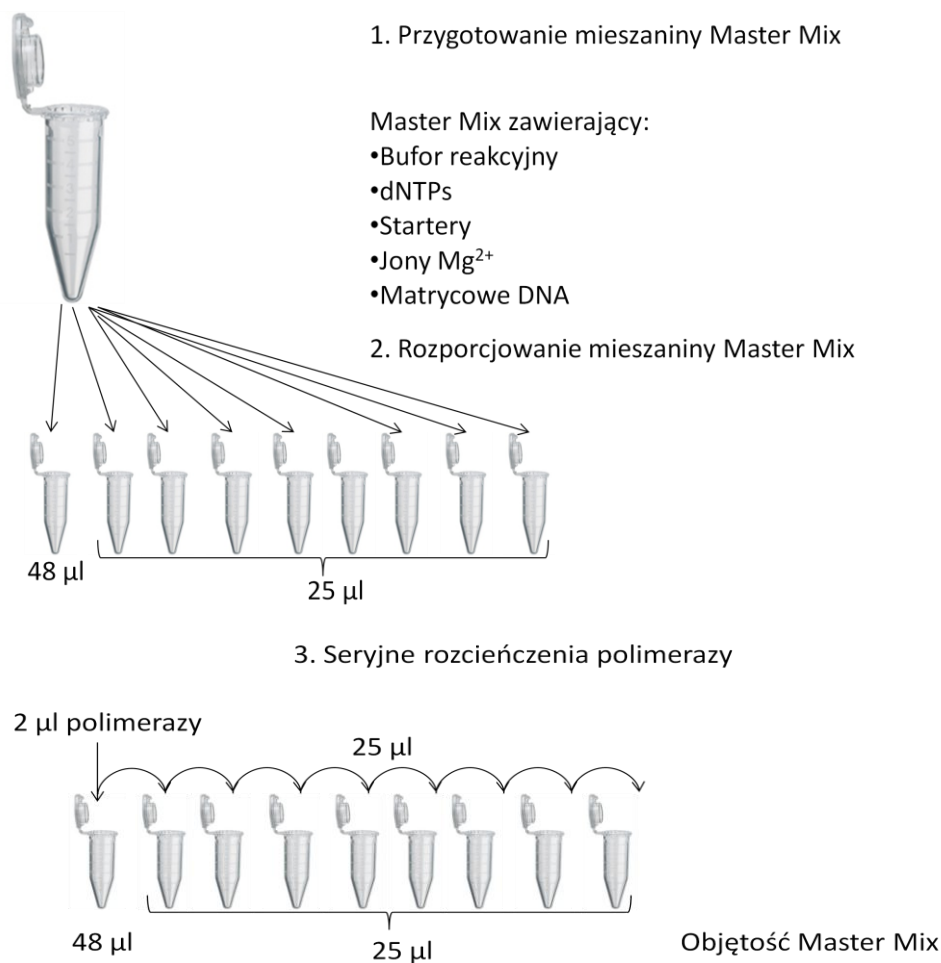
Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykle
95	180	
95	30	
55	30	30
72	30	
72	180	

Wynik amplifikacji przedstawia rycina nr 57.



Rycina 57 Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA w gradiencie stężenia krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej M-Marker wielkości 100-1000, ścieżki 1-5 wzrastające stężenie krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej odpowiednio: 1-0%, 2-5%, 3-10%, 4-25%, 5-40%.

Otrzymane wyniki potwierdziły właściwości obniżonej wrażliwości na inhibitory polimerazy OmniKlenTaq umożliwiające amplifikację nawet przy 40% krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej. W celu dalszego zastosowania polimerazy w opracowanych układach diagnostycznych niezbędne było określenie jednostkowości preparatu komercyjnego. Do tego celu wykorzystałem polimerazę TaqNova (firmy Blirt S.A.) o znanej jednostkowości i przeprowadziłem reakcje amplifikacji w gradiencie stężenia polimerazy równoległe z seryjnymi dwukrotnymi rozcieńczeniami polimerazy OmniKlenTaq. Schemat przygotowania seryjnych rozcieńczeń przedstawia rycina nr 58. W przypadku polimerazy OmniKlenTaq rozcieńczenia prowadziłem poprzez dodanie 0,5 µl polimerazy do 49,75 µl mieszaniny Master Mix w pierwszej próbówce (zgodnie z zaleceniami producenta).



Rycina 58 Schemat przygotowania dwukrotnych seryjnych rozcieńczeń polimerazy w mieszaninach reakcyjnych.

Warunki reakcji oraz skład mieszanin reakcyjnych przedstawiają odpowiednio tabele nr 97, 98 i 99.

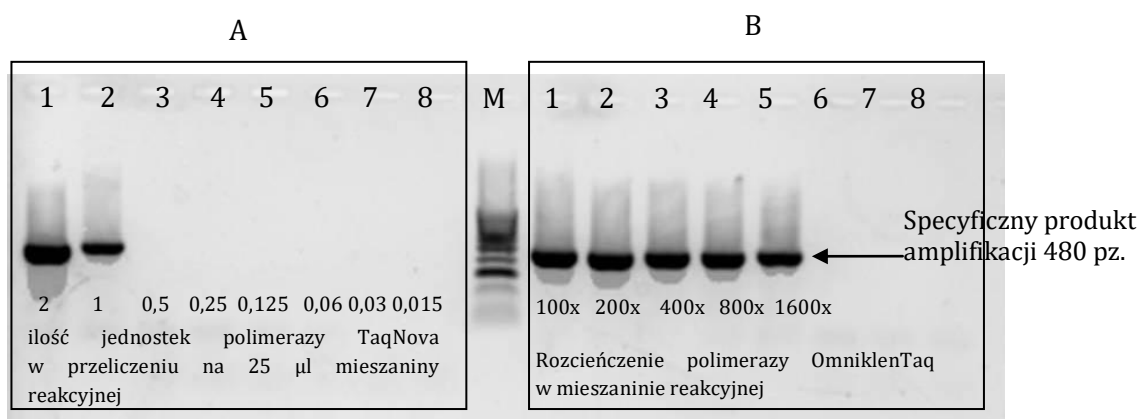
Tabela 98 Skład mieszaniny reakcyjnej do ustalenia jednostkowości polimerazy OmniKlenTaq.

Odczynniki	Objętość [µl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	Do 25	-
10x OmniKlen bufor	2,5	1x
Starter 18SF [10µM]	1	0,5 µM
Starter 18SR [10µM]	1	0,5 µM
dNTPs [8mM]	2	0,64 mM
DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 [23 ng/µl]	2	1,84 ng/µl
Polimeraza OmniKlenTaq	Seryjne rozcieńczenia	-

Tabela 99 Skład mieszaniny reakcyjnej dla seryjnych rozcieńczeń polimerazy TaqNova

Odczynniki	Objętość [μ l]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	Do 25	-
10x bufor KCl	2,5	1x
Starter 18SF [10 μ M]	1	0,5 μ M
Starter 18SR [10 μ M]	1	0,5 μ M
dNTPs [8mM]	2	0,64 mM
MgCl ₂ [50mM]	1,5	3 mM
DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 [23 ng/ μ l]	2	1,84 ng/ μ l
Polimeraza TaqNova [2U/ μ l]	Seryjne rozcieńczenia	-

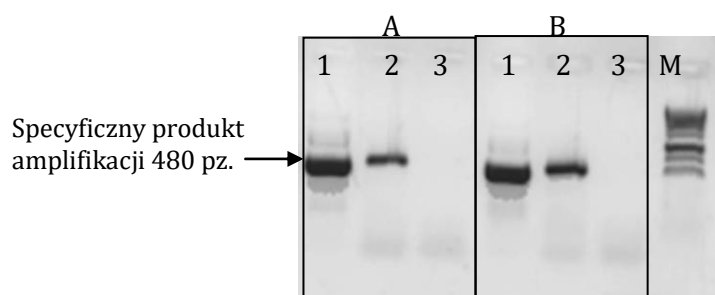
Wynik amplifikacji w gradiencie stężenia polimeraz (TaqNova 2U/ μ l i OmniKlenTaq) przedstawia rycina nr 59.



Rycina 59 Wynik rozdzielania elektroforetycznego w ...% żelu agarozowym produktów reakcji amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA z zastosowaniem gradientu polimerazy TaqNova oraz OmniKlenTaq M-marker wielkości 100-1000, 1-8 seryjne dwukrotne rozcieńczenia polimerazy A-TaqNova B-OmniKlenTaq.

Otrzymane wyniki wskazują, że polimeraza TaqNova pozwala na uzyskanie specyficznego amplikonu w badanym układzie przy stężeniu 0,04 U/ μ l. Oznacza to w przeliczeniu 1U polimerazy w 25 μ l mieszaniny reakcyjnej. Wyjściowo do przygotowania rozcieńczeń użyłem 0,5 μ l polimerazy OmniKlenTaq w objętości 50 μ l. Zatem produkt został początkowo rozcieńczony 100 krotnie, a następnie w serii 2-krotnych rozcieńczeń. Maksymalne rozcieńczenie, dla którego otrzymałem pozytywny wynik reakcji amplifikacji wynosi 1600x. Odnosząc to do obliczonego stężenia polimerazy TaqNova można przyjąć, że stężenie polimerazy dla tego rozcieńczenia wynosiło 0,04 U/ μ l. Oznacza, że wyjściowe stężenie polimerazy OmniKlenTaq wynosi 0,04 U/ μ l x 1600 = 64 U/ μ l. Jest to znacznie wyższe stężenie niż dla powszechnie dostępnych komercyjnych polimeraz. W związku z tym, żeby wykluczyć wpływ tak wysokiego stężenia enzymu na badanie właściwości związanych z wrażliwością na inhibitory, postanowiłem doprowadzić jednostkowość polimerazy OmniKlenTaq do 2U/ μ l. Na podstawie obliczonej jednostkowości rozcieńczyłem 30-krotnie komercyjny preparat w standardowym buforze do przechowywania

polimeraz (20 mM Tris-HCl (pH 8,0 w 25°C), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% (v/v) Nonidet P40, 0,5% (v/v) Tween 20, 50% (v/v) glicerol). W celu potwierdzenia uzyskania takiego samego stężenia polimerazy OmniKlenTaq jak TaqNova przeprowadziłem ponownie eksperyment z seryjnymi rozcieńczeniami polimeraz tym razem dodając po 2 µl każdego z produktów do 48 µl mieszaniny master mix zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie nr 58. Reakcję amplifikacji prowadziłem zgodnie z profilem temperaturowo-czasowym i składem mieszanin reakcyjnych przedstawionych w tabelach nr 97,98 i 99. Wyniki przedstawia rycina nr 60.



Rycina 60 Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA dla seryjnych rozcieńczeń polimerazy TaqNova oraz 30 krotnie rozcieńczonej OmniKlenTaq M-marker wielkości 500-6000, ścieżki 1-4 seryjne 2-krotne rozcieńczenia polimeraz: A-TaqNova, B-30x OmniKlenTaq.

Uzyskany wynik potwierdza poprawność wyznaczonego stężenia polimerazy OmniKlenTaq. Po jej 30-krotnym rozcieńczeniu uzyskałem identyczny wynik amplifikacji dla seryjnych dwukrotnych rozcieńczeń enzymu w mieszaninie reakcyjnej jak dla polimerazy TaqNova o zdefiniowanej przez producenta jednostkowości 2U/µl. W kolejnym etapie przeprowadziłem eksperyment mający na celu zbadanie wrażliwości polimerazy OmniKlenTaq na inhibitory przy stężeniach enzymu stosowanych w standardowych reakcjach PCR. Równolegle przeprowadziłem amplifikację z wykorzystaniem standardowej polimerazy TaqNova. Skład mieszanin reakcyjnych oraz profil temperaturowo czasowy przedstawiają tabele nr 97, 100 i 101.

Tabela 100 Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA z rozcieńczoną polimerazą OmniKlenTaq w gradiencie stężeń krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej.

Odczynniki	Objętość [µl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	Do 25	-
10x OmniKlen bufor	2,5	1x
Starter 18SF [10µM]	1	0,5 µM
Starter 18SR [10µM]	1	0,5 µM
dNTPs [8mM]	2	0,64 mM
DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 [23 ng/µl]	2	1,84 ng/µl
30x rozc. polimeraza OmniKlenTaq	1	-
Krew pełna	0-10*	0-40%

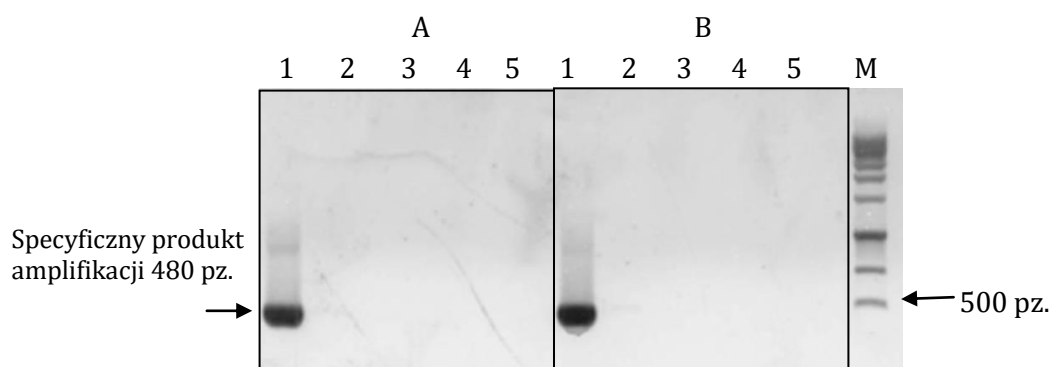
*zakres stosowanych objętości krwi pełnej dodawanej do mieszaniny reakcyjnej od 0 do 10 µl.

Tabela 101 Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA z polimerazą TaqNova w gradiencie stężeń krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej.

Odczynniki	Objętość [μ l]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	Do 25	-
10x bufor KCl	2,5	1x
Starter 18SF [10 μ M]	1	0,5 μ M
Starter 18SR [10 μ M]	1	0,5 μ M
dNTPs [8mM]	2	0,64 mM
MgCl ₂ [50mM]	1,5	3 mM
DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 [23 ng/ μ l]	2	1,84 ng/ μ l
Polimeraza TaqNova [2U/ μ l]	1	0,08 U/ μ l
Krew pełna	0-10	0-40%

* zakres stosowanych objętości krwi pełnej dodawanej do mieszaniny reakcyjnej od 0 do 10 μ l.

Wyniki przedstawia rycina nr 61.



Rycina 61 Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA w gradiencie stężenia krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej z zastosowaniem 1U polimerazy TaqNova (A) i OmniKlenTaq (B) w 25 μ l mieszaniny reakcyjnej M-marker wielkości 500-6000 ścieżki 1-5 gradient stężenia krwi pełnej: 0%, 10%, 20%, 30%, 40%.

Wynik amplifikacji wskazuje na to, że w przypadku obu polimeraz (TaqNova oraz OmniKlenTaq) nastąpiła inhibicja reakcji PCR już przy 10% zawartości krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej. Jest to wynik oczekiwany dla polimerazy TaqNova, która w żaden sposób nie została zmodyfikowana pod kątem zwiększenia oporności na inhibicję. Zaskakujący jest natomiast rezultat dla polimerazy OmniKlenTaq w przypadku której nastąpiła inhibicja w równym stopniu jak dla polimerazy nie przeznaczonej do amplifikacji w obecności inhibitorów. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdziłem, że pozytywny wynik amplifikacji w obecności nawet 40% krwi dla z zastosowaniem polimerazy OmniKlenTaq możliwy był dzięki bardzo wysokiemu stężeniu enzymu w mieszaninie reakcyjnej.

W celu zbadania wzajemnych korelacji pomiędzy stężeniami polimerazy DNA oraz krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej przeprowadziłem reakcje dla różnego stężenia krwi w gradiencie stężenia polimerazy. Eksperyment przeprowadziłem dla

polimerazy OmniKlenTaq. Skład mieszanin reakcyjnych oraz profil temperaturowo-czasowy przedstawiają tabele nr 97 i 102.

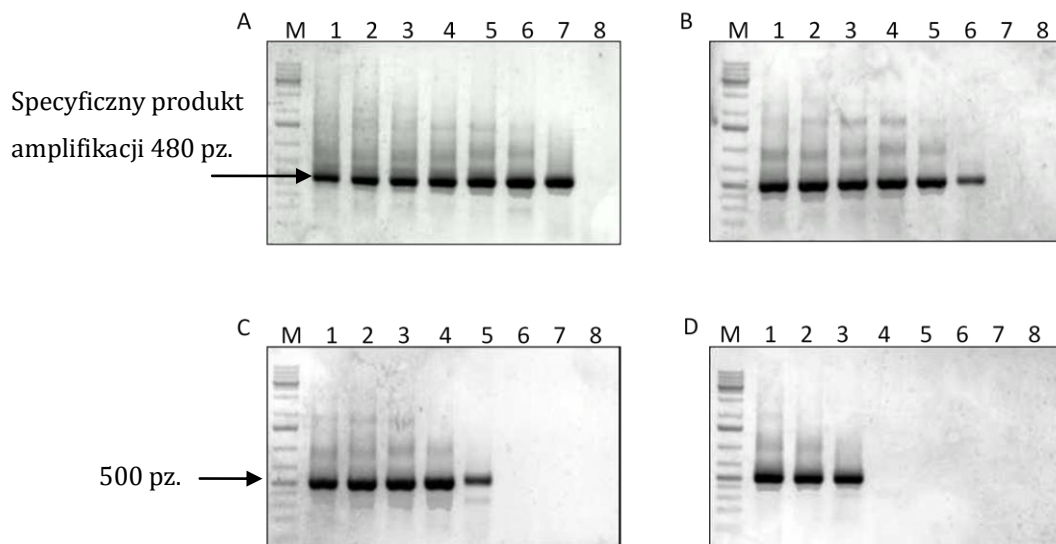
Tabela 102 Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA w gradiencie polimerazy OmniKlenTaq dla różnych stężeń krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej.

Odczynniki	Objętość [μ l]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	Do 25	-
10x OmniKlen bufor	2,5	1x
Starter 18SF [10 μ M]	1	0,5 μ M
Starter 18SR [10 μ M]	1	0,5 μ M
dNTPs [8mM]	2	0,64 mM
DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 [23 ng/ μ l]	2	1,84 ng/ μ l
Polimeraza OmniKlenTaq	0,004-0,5*	0,01-1,2 U/ μ l
Krew pełna	0-7,5**	0-30%

*przygotowane za pomocą seryjnych 2-krotnych rozcieńczeń

** stosowane objętości krwi pełnej dodawanej do mieszaniny reakcyjnej od 0 do 7,5 μ l

Wynik amplifikacji przedstawia rycina nr 62.



Rycina 62 Wynik rozdzielania elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów reakcji amplifikacji w obecności różnej zawartości krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej A-0% B-10% C-20% D-30%, M-marker wielkości 1kb Fermentas, ścieżki 1-8 odpowiadają różnemu stężeniu polimerazy OmniKlenTaq w mieszaninie reakcyjnej odpowiednio: 1-1,2; 2-0,6; 3-0,3; 4-0,15; 5-0,075; 6-0,04; 7-0,02; 8-0,01 [U/ μ l].

Otrzymany wynik potwierdza zależność pomiędzy granicznym stężeniem polimerazy, dla którego powstawał produkt PCR, a zawartością krwi w mieszaninie reakcyjnej. Im wyższe stężenie krwi, tym przy wyższym stężeniu polimerazy dochodzi do inhibicji reakcji PCR. W przypadku braku inhibitorów w mieszaninie reakcyjnej przy wyższych stężeniach polimerazy wydajność amplifikacji spada. Dla każdego ze stężeń inhibitorów zbyt duża ilość polimerazy skutkuje powstawaniem niespecyficznych amplikonów. Przeprowadzony eksperyment wykazał, że możliwe jest uzyskiwanie wydajnej amplifikacji w obecności nawet 30% krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej

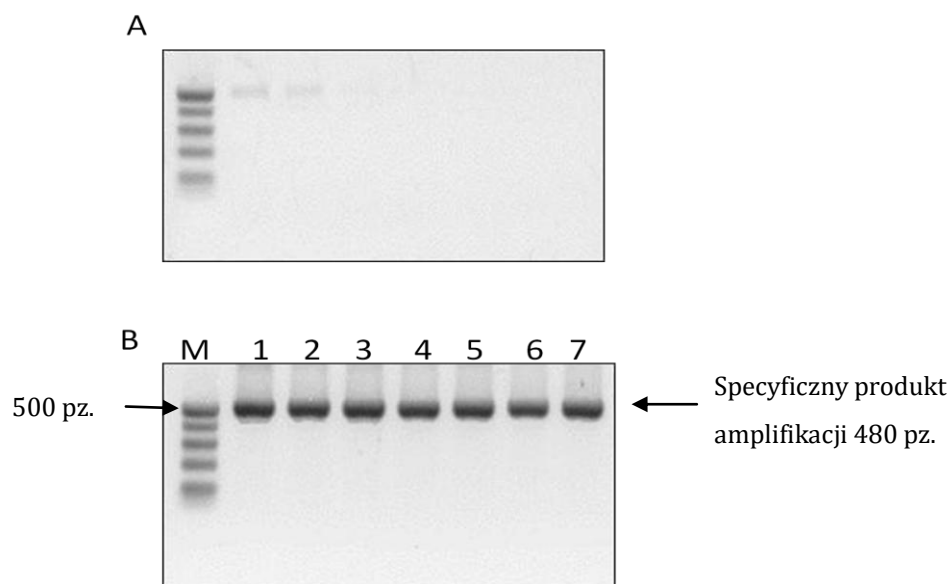
przy odpowiednio wysokim stężeniu polimerazy OmniKlenTaq. Jednym z mechanizmów wyjaśniających wynik eksperymentu może być efekt stłoczenia molekularnego wywołanego przez wysokie stężenie białka w mieszaninie reakcyjnej. W celu potwierdzenia tej hipotezy przeprowadziłem amplifikację przy granicznym stężeniu polimerazy (pierwszym niedającym amplifikacji) dla 30% stężenia krwi w mieszaninie reakcyjnej (0,15 U/μl). Zastosowałem gradient stężenia BSA w celu symulacji zjawiska tłoku molekularnego wywołanego przez inne białko niż polimeraza DNA. Skład mieszanin reakcyjnych oraz profil temperaturowo czasowy reakcji przedstawiają tabele nr 97 i 103.

Tabela 103 Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA w gradiencie stężenia BSA i 30% krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej.

Odczynniki	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	Do 25	-
10x OmniKlen bufor	2,5	1x
Starter 18SF [10μM]	1	0,5 μM
Starter 18SR [10μM]	1	0,5 μM
dNTPs [8mM]	2	0,64 mM
DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 [23 ng/μl]	2	1,84 ng/μl
Polimeraza OmniKlenTaq	0,6	0, U/μl
BSA [1mg/ml]	0-6	0-0,24 mg/ml
Krew pełna	0/7,5*	0/30%

*stosowane objętości krwi pełnej dodawanej do mieszaniny reakcyjnej 0 lub 7,5 μl.

Wyniki przedstawia rycina nr 63



Rycina 63 Wynik rozdziálu elektroforetycznego produktów amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA przy stężeniu krwi w mieszaninie reakcyjnej 30%-A i 0%-B w gradiencie stężenia BSA z zastosowaniem granicznego stężenia polimerazy OmniKlenTaq skutkujący inhibicją reakcji PCR przy 30% krwi, M-marker wielkości 100-500, ścieżki odpowiadają gradientowi stężenia BSA: 1-0, 2-0,04, 3-0,08, 4-0,12, 5-0,16, 6-0,2, 7-0,24 [mg/ml].

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że tłok molekularny spowodowany zwiększającym się stężeniem BSA w mieszaninie reakcyjnej nie przyniósł efektu w postaci zniwelowania skutków inhibicji przy 30% stężeniu krwi. Jednocześnie wynik otrzymany dla reakcji bez krwi wskazuje na brak inhibicji spowodowany obecnością BSA, jak również potwierdza, że dla danego stężenia polimerazy w przypadku braku inhibicji otrzymywany jest wydajny produkt amplifikacji. Prowadzi to do wniosku, że efekt inhibicji niwelowany jest przez zwiększenie stężenia polimerazy DNA w mieszaninie reakcyjnej. Mechanizm ten może polegać na oddziaływaniu cząsteczek polimerazy z inhibitorami, które np. blokują centrum aktywne lub modyfikują strukturę białka. Poprzez zaangażowanie części cząsteczek polimerazy w interakcję z inhibitorami następuje wymiarczkowanie inhibitorów w mieszaninie reakcyjnej, dzięki czemu pozostałe cząsteczki enzymu biorą udział w reakcji amplifikacji. W celu weryfikacji takiej hipotezy przeprowadziłem eksperyment polegający na przeprowadzeniu reakcji PCR z wykorzystaniem niemodyfikowanej polimerazy DNA o standardowych właściwościach, jednak o znacznie wyższym stężeniu niż dostępne komercyjnie. Wykorzystałem do tego celu polimerazę TaqNova o stężeniu 2U/μl, którą zagęściłem 30 krotnie uzyskując jednostkowość na poziomie 60U/μl. Tak przygotowany preparat posłużył do przygotowania reakcji PCR przy stężeniu krwi 0 i 30%, według składu przedstawionego w tabeli nr 104. Profil temperaturowo-czasowy reakcji był zgodny z tabelą nr 97.

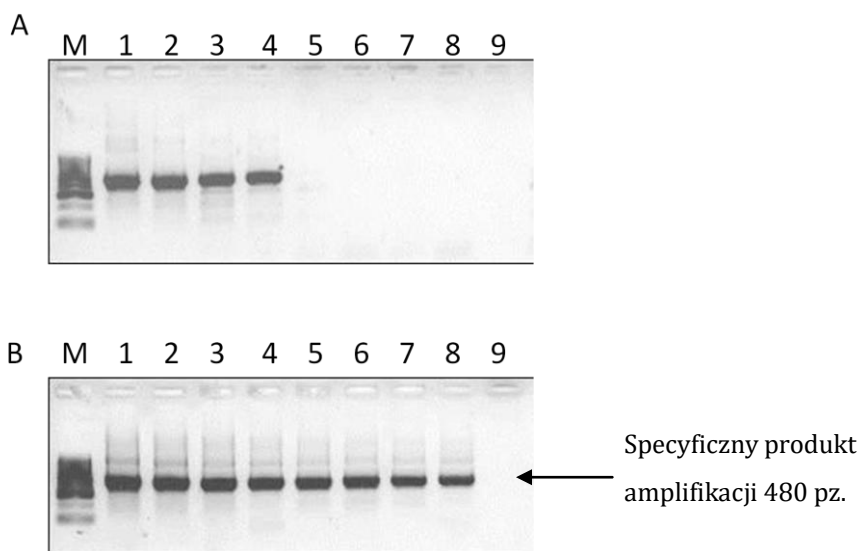
Tabela 104 Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA z polimerazą TaqNova w gradiencie stężeń krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej.

Odczynniki	Objętość [μl]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	Do 25	-
10x bufor KCl	2,5	1x
Starter 18SF [10μM]	1	0,5 μM
Starter 18SR [10μM]	1	0,5 μM
dNTPs [8mM]	2	0,64 mM
MgCl ₂ [50mM]	1,5	3 mM
DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 [23 ng/μl]	2	1,84 ng/μl
Polimeraza TaqNova [60U/μl]	0,004-1*	0,01-2,4 U/μl
Krew pełna	0/7,5**	0/30%

*przygotowane za pomocą seryjnych 2-krotnych rozcieńczeń

**stosowane objętości krwi pełnej dodawanej do mieszaniny reakcyjnej 0 lub 7,5 μl.

Wynik amplifikacji przedstawia rycina nr 64.

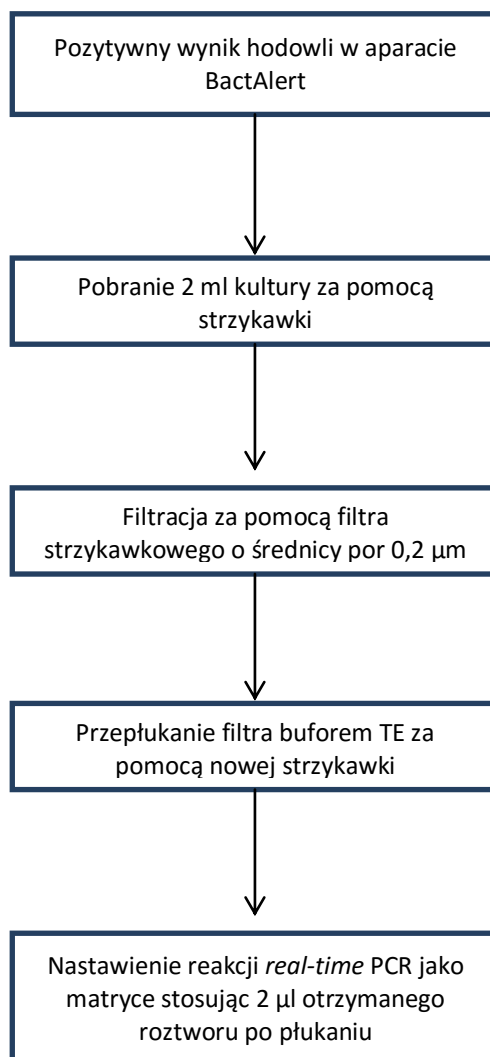


Rycina 64 Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA w przypadku A-30% i B-0% krwi w mieszaninie reakcyjnej z zastosowaniem gradientu stężenia polimerazy TaqNova, M-marker wielkości 100-1000, ścieżki odpowiadają stężeniu polimerazy: 1-2,4; 2-1,2; 3-0,6; 4-0,3; 5-0,15; 6-0,075; 7-0,04; 8-0,02; 9-0,01 [U/ μ l].

Otrzymany wynik wskazuje na to, że zwiększenie stężenia polimerazy w reakcji PCR przeciwdziała inhibicji w przypadku obecności nawet 30% krwi w mieszaninie reakcyjnej. Potwierdza to również hipotezę mechanizmu polegającego na inaktywację części polimerazy znajdującej się w mieszaninie reakcyjnej co powoduje brak wolnych inhibitorów do oddziaływania z pozostałymi cząsteczkami białka, które katalizują reakcję amplifikacji fragmentów DNA.

5.6. Opracowanie procedury diagnostycznej do identyfikacji gatunkowej drożdżaków z rodzaju *Candida* z pozytywnych hodowli krwi z aparatu BactAlert®

Otrzymane wyniki badań postanowiłem wykorzystać do zaprojektowania procedury diagnostycznej umożliwiającej amplifikację bezpośrednio z pozytywnej kultury krwi z pominięciem etapów hodowli na podłożach stałych oraz oczyszczania kwasów nukleinowych. Do tego celu wybrałem metodę *real-time* PCR ponieważ charakteryzuje się ona najwyższą czułością. Opracowaną procedurę diagnostyczną przedstawia rycina nr 65.



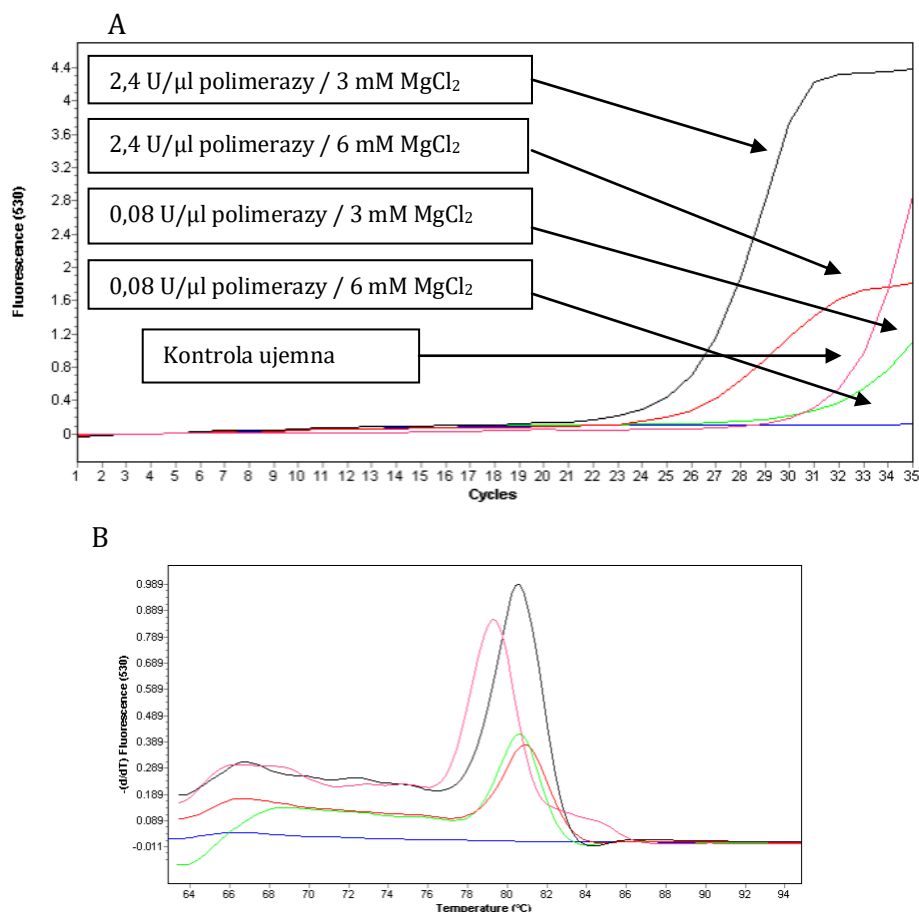
Rycina 65 Schemat postępowania w celu przygotowania próbki pochodzącej z pozytywnej hodowli krwi z butelki hodowlanej BactAlert® do identyfikacji gatunkowej za pomocą reakcji *rel-time* PCR.

Do amplifikacji układu opartego o gen akonitazy zoptymalizowałem skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystując polimerazę OmniKlenTaq i barwnik interkalujący EvaGreen®. Optymalizację przeprowadziłem na pozytywnej hodowli zidentyfikowanej jako *C. albicans*. Reakcję przeprowadziłem również dla dwukrotnie zwiększonego stężenia magnezu w celu sprawdzenia czy podniesie to wydajność reakcji amplifikacji. Jednocześnie przeprowadziłem reakcje dla polimerazy o standardowej jednostkowości. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy przedstawiają tabele nr 89 i 105.

Tabela 105 Skład mieszaniny reakcyjnej do identyfikacji *C.albicans* bezpośrednio z pozytywnej hodowli krwi

Odczynniki	Objętość [μ l]	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej
woda	Do 20	-
10x bufor OmniKlenTaq	2	1x
Starter AcoF [10μ M]	1	0,5 μ M
Starter AcoReal [10μ M]	1	0,5 μ M
dNTPs [8mM]	2	0,64 mM
MgCl ₂ [50mM]	1,5/3	3/6 mM
Barwnik EvaGreen 50x	0,4	1x
Polimeraza [60U/ μ l]/[2U/ μ l]	OmniKlenTaq 0,8	2,4/0,08 U/ μ l
Filtrat z hodowli krwi	2	-

Wynik przedstawia rycina nr 66.



Rycina 66 A- Wynik amplifikacji przeprowadzonej w kierunku identyfikacji *C. albicans* z pozytywnej próbki krwi, B-krzywe topnienia amplikonów.

Wynik amplifikacji potwierdza wysuniętą hipotezę, że zwiększenie stężenia polimerazy przeciwdziała inhibicji reakcji PCR w przypadku obecności krwi w mieszaninie reakcyjnej. Uzyskałem wydajnie specyficzny produkt przy stężeniu

polimerazy 2,4 U/ μ l i jonów magnezu 3mM. Przy niższym stężeniu polimerazy (0,08 U/ μ l) doszło do inhibicji reakcji PCR. Otrzymałem również amplifikację dla kontroli negatywnej (bez DNA) jednak wartość Ct na poziomie 32 cyklu oraz niższa temperatura topnienia amplikonu względem produktu specyficznego może świadczyć o tym, że jest to produkt powstający ze struktur dimerów starterów obecnych w mieszaninie reakcyjnej. Powodem tego może być fakt, że polimeraza OmniKlenTaq nie jest dedykowana do reakcji *real-time* PCR i nie posiada właściwości typu *hot start*.

6. Podsumowanie

Celem prowadzonych badań było opracowanie układów diagnostycznych do identyfikacji rodzajowej i gatunkowej drożdżaków *Candida* w oparciu o reakcje amplifikacji specyficznych fragmentów DNA. Założenia podjętego zadania badawczego obejmowały poszukiwanie nowych celów molekularnych specyficznych zarówno gatunkowo jak i rodzajowo.

Wynikiem realizacji planów badawczych jest opracowanie 16 układów diagnostycznych wykorzystujących 5 różnych metod opartych o techniki amplifikacji kwasów nukleinowych: tRFLP PCR, prosty PCR, złożony PCR, *real-time* PCR oraz złożony *real-time* PCR. W zaprojektowanych reakcjach diagnostycznych wykorzystałem 5 genów (*lys21*, *aco2*, *eno1*, *trf4*, *fks1*), których fragmenty stanowiły specyficzne gatunkowo oraz rodzajowo cele molekularne. Trzy z tych genów wykorzystałem po raz pierwszy i do tej pory nie były opisane w piśmiennictwie pod kątem wykorzystania w diagnostyce zakażeń wywoływanych przez drożdżaki z rodzaju *Candida* (gen syntazy homocytrynianowej, akonitazy oraz enolazy). Nowością jest również wykorzystanie metody tRFLP do identyfikacji gatunkowej drobnoustrojów. Wszystkie opracowane układy diagnostyczne przedstawiłem w tabeli nr 106.

Tabela 106 Opracowane układy diagnostyczne do identyfikacji drożdżaków z rodzaju *Candida*

Lp.	Metoda	Cel molekularny	Wykrywane gatunki
1	PCR	<i>lys21</i>	pan- <i>Candida</i>
2	PCR tRFLP	<i>lys21</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i>
3	PCR	<i>aco2</i>	<i>C. albicans</i>
4	PCR	<i>eno1</i>	<i>C. krusei</i>
5	PCR	<i>trf4</i>	<i>C. glabrata</i>
6	PCR	<i>trf4</i>	<i>C. tropicalis</i>
7	Złożony PCR	<i>lys21, aco2, eno1, trf4, fks1</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>
8	<i>Real-time</i> PCR	<i>aco2</i>	<i>C. albicans</i>
9	<i>Real-time</i> PCR	<i>eno1</i>	<i>C. krusei</i>
10	<i>Real-time</i> PCR	<i>trf4</i>	<i>C. glabrata</i>
11	<i>Real-time</i> PCR	<i>trf4</i>	<i>C. tropicalis</i>
12	<i>Real-time</i> PCR	<i>lys21</i>	<i>C. parapsilosis</i>
13	<i>Real-time</i> PCR	<i>lys21</i>	pan- <i>Candida</i> (analiza profilu topnienia umożliwia identyfikację <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>)
14	Złożony <i>real-time</i> PCR	<i>lys21, trf4</i>	<i>C. parapsilosis</i> . <i>C. tropicalis</i>
15	Złożony <i>real-time</i> PCR	<i>aco, eno</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i>
16	Złożony <i>real-time</i> PCR	<i>lys21, trf4, eno</i>	<i>C. parapsilosis</i> . <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i>

Dzięki nawiązaniu współpracy z Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego miałem możliwość zarówno wstępnej walidacji opracowanych układów diagnostycznych z wykorzystaniem szczepów klinicznych jak również dostosowanie projektowanych metod diagnostycznych do procedur i warunków prowadzenia badań w klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych. Pozwoliło to na znaczne podniesienie potencjału aplikacyjnego wyników badań. Wybrałem 4 układy (tRFLP, złożony PCR, złożony *real-time* PCR oraz pan-*Candida real-time* PCR), za pomocą których przeprowadziłem identyfikację gatunkową 104

klinicznych szczepów drożdżaków izolowanych od pacjentów Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Dla wszystkich izolatów otrzymałem poprawne wyniki identyfikacji w odniesieniu do oznaczenia gatunkowego wykonanego w Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej zgodnie z obowiązującymi tam procedurami diagnostycznymi. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że opracowane układy do identyfikacji gatunkowej i rodzajowej drożdżaków *Candida* mogą być wykorzystane w molekularnej diagnostyce klinicznej. W wyniku analizy procedury diagnostycznej pod kątem czasu potrzebnego na określenie przynależności gatunkowej drożdżaków obecnych w badanym materiale klinicznym wykazałem, że wdrożenie metod molekularnych skraca czas identyfikacji z kilku dni do nawet kilku godzin. Skrócenie czasu badania przekłada się bezpośrednio na szybkość wdrożenia odpowiedniego leczenia co zwiększa szanse na wyleczenie pacjentów szczególnie w przypadkach kandydemii.

W związku z tym, że w materiale klinicznym znajduje się wiele związków będących inhibitorami reakcji PCR w swojej pracy podjąłem również problem przeciwdziałania inhibicji reakcji PCR. Jako materiał do badań wybrałem krew, gdyż to w przypadku zakażeń układowych szybka i poprawna diagnostyka ma kluczowe znaczenie dla przeżycia pacjenta. Założeniem było opracowanie takiego sposobu przygotowania próbki badanej oraz optymalizacja składu mieszaniny reakcyjnej aby możliwe było przeprowadzenie oznaczenia bez konieczności hodowli drożdżaków na dodatkowych podłożach. W wyniku przeprowadzonych badań wykazałem, że zwiększenie ilości polimerazy w mieszaninie reakcyjnej skutecznie przeciwdziała inhibicji reakcji amplifikacji skutkując wydajnym otrzymywaniem specyficznych produktów reakcji. W związku z tym, że często stężenie drobnoustrojów we krwi jest niskie oraz biorąc pod uwagę możliwości ekonomiczne i procedury obecne w laboratoriach klinicznych opracowałem metodę do identyfikacji drożdżaków z rodzaju *Candida* z pozytywnych hodowli krwi w butelkach BactAlert®. Tego rodzaju podejście nie wymaga rozszerzenia procedury badawczej o pobranie dodatkowej próbki krwi od pacjenta do badań molekularnych. Ponadto analizie poddaje się jedynie takie próbki, które dały pozytywny wynik w hodowli co obniża koszty o badanie próbek negatywnych. Pomimo tego, że metody molekularne w proponowanej przeze mnie procedurze diagnostycznej są stosowane dopiero po uzyskaniu pozytywnej hodowli krwi to i tak powoduje to skrócenie czasu identyfikacji gatunkowej w kierunku *Candida* spp. nawet o dwa dni.

Podsumowując można stwierdzić, że w trakcie realizacji pracy doktorskiej zrealizowałem postawione cel i założenia badawcze. Z powodzeniem opracowałem szereg układów diagnostycznych o wysokim potencjale aplikacyjnym w procedurach badawczych klinicznych laboratoriów mikrobiologicznych. Do tego celu wykorzystałem nieopisane dotychczas cele molekularne do identyfikacji gatunkowej i rodzajowej *Candida*. Wykazałem ich specyficzność gatunkową i rodzajową zarówno na szczepach referencyjnych jak i klinicznych. Opracowałem również procedurę i metodykę identyfikacji gatunkowej drożdżaków *Candida* z pozytywnych hodowli krwi.

Otrzymane przeze mnie wyniki badań stanowią również podstawy do kontynuacji badań w kierunku poznawania mechanizmów inhibicji reakcji PCR przez związki obecne w materiałach klinicznych. Zastosowanie po raz pierwszy metody tRFLP do identyfikacji gatunkowej drobnoustrojów może prowadzić do wykorzystania jej w przypadku innych mikroorganizmów, a w szczególności takich, które stanowią problemy diagnostyczne nawet z zastosowaniem metod molekularnych. Opracowane układy diagnostyczne wykorzystujące reakcję *real-time* PCR mogą zostać wzbogacone o specyficzne sondy molekularne co dodatkowo podniesie ich specyficzność oraz wyeliminuje konieczność analizy profili topnienia co uprości interpretację wyników.

7. Literatura

- Al-Soud W, Radtrsom P, 2000, Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4463-4470.
- Al-Soud WA, Radstrom P, 2001, Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 485-493.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clemont G, Carcillo J, Pinsky MR, 2001, *Critical Care medicine*, 29, 1303-1310.
- Belec L, Authier J, Eliezer-Vanerot MC, Piedouillet C, Mohamed AS, Gherardi RK, 1998, Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase, *Muscle and Nerve*, 21, 1064-1067.
- Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC, 1996, Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCRinhibition caused by calcium ionsm *Letters in Applied Microbiology*, 22, 153-158.

- Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA, 2002, Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients, *American Journal of Medicine*, 113, 480-485.
- Bouza E, Muñoz P, 2008, Epidemiology of candidemia in intensive care units, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, S87–S91.
- Bouza E, Perez-Molina J, Munoz P, 1999, Report of ESGNI01 and ESGNI02 studies, Bloodstream infections in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 5, 2S1–2S12.
- Broeders SR, Keersmaecker SC, Roosens NH, 2012, How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1, 1-2.
- Burgener-Kairuz P, Zuber JP, Jaunin P, Buchman TG, Bille J, Rossier M, 1994, Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-alpha-demethylase (L1A1) gene fragment, *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1902-7.
- Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barret SL, LaFe K, Bui U, Limaye AP, Cookson BT, 2001, Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 4042-4051.
- Costa Francez PA, Rodrigues EM, Velasco AM, Santos SE, 2012, Insertion-deletion polymorphisms--utilization on forensic analysis, *international Journal of Legal Medicine*, 126, 491-496.
- Crampin AC, Matthews RC, 1993, Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment, *Journal of Medical Microbiology*, 39, 233-238.
- Demeke T, Adams RP, 1992, The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR, *Biotechniques*, 12, 332-334.
- Denning DW, Hope WW, 2010, Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities, *Trends in Microbiology*, 18, 195-204.
- Dunn J, Obuekwe J, Baun T, Rogers J, Patel T, Snow L, 2014, Prompt detection of influenza A and B viruses using the BD Veritor™ System Flu A+B, Quidel® Sofia® Influenza A+B FIA, and Alere BinaxNOW® Influenza A&B compared to real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 79, 10-3.

- Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E, 2000, Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271, 726-730.
- Eischeid AC, 2011, SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR, *BMC Research Notes*, 4, 263.
- Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ, 1998, Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes, *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 3260-5.
- Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ, 1998, Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes, *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 3260-3265.
- Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ, 2010, Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review, *International Journal of Infectious Diseases*, 14, E954-E966.
- Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M, 1998, Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans* – secreted aspartic proteinase genes, *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 395-401.
- Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M, 1998, Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans* – secreted aspartic proteinase genes, *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 395-401.
- Fricke S, Fricke C, Schimmelpfennig C, Oelkrug C, Schonfelder U, Blatz R, Zilch C, Faber S, Hilger N, Ruhnke M, Rodloff AC, 2010, A real-time PCR assay for the differentiation of *Candida* species, *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1150-1158.
- Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T, 2001, Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 3617-3622
- Gharizadeh B, Norberg E, Loffler J, Jalal S, Tollemar J, Einsele H, Klingspor L, Nyren P, 2004, Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology, *Mycoses*, 47, 29-33.
- Grag B, Adam T, Zill E, Gobel UB, 2000, Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Yeasts and Yeast-Like Organisms, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1782-1785.
- Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A, 2007, Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature, *Nucleic Acids Research*, 35, e127.

- Harris DM, Hata DJ, 2013, Rapid identification of bacteria and *Candida* using PNA-FISH from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 7, 12:2.
- Hendolin P, Paulin L, Koukkila-Kähkölä P, Anttila V, Malmberg H, Richardsson M, Ylikoski J, 2002, Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4186-4192.
- Houang ETS, Chu KC, Koehler AP, Cheng AFB, 1997, Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory, *Journal of Clinical Pathology*, 50, 563-565.
- Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, Liao MH, Lin YH, Li SY, 2003, Species identification of medically important fungi by use of realtime LightCycler PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 1071-1076.
- Innings A, Ullberg M, Johansson A, Rubin CJ, 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, 874-880.
- Jensen KH, Dargis R, Christensen JJ, Kemp M, 2014, Ribosomal PCR and DNA sequencing for detection and identification of bacteria: experience from 6 years of routine analyses of patient samples, *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 122, 248-255.
- Kan VL, 1993, Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia, *Journal of Infectious Diseases*, 168, 779-83.
- Kanbe T, Horii T, Arishima T, Ozeki M, Kikuchi A, 2002, PCR based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes, *Yeast*, 19, 973-989.
- Katcher HL, Schwartz I, 1994, A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol, *Biotechniques*, 16, 84-92.
- Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, Barnes WM, 2009, Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples, *Nucleic Acids Research*, 37, e40.
- Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL, 2011, Extended Prevalence of Infection in ICU Study (EPIC II) Group of Investigators. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study, *Critical Care Medicine*, 39, 665-670.
- Kim CH, Khan M, Morin DE, Hurley WL, Tripathy DN, Kehrli M, Oluoch AO, Kakoma I, 2001, Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk, *Journal of Dairy Science*, 84, 74-83.
- Klingspor L, Jalal S, 2006, Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using realtime PCR, *Clinical Microbiology and Infections*, 12, 745-753.

- Lantz PG, Matsson M, Wadstrom T, Radstrom P, 1997, Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR, *Journal of Microbiological Methods*, 28, 159-167.
- Lau A, Chen S, Sorell T, Carter D, Malik R, Martin P, Halliday C, 2007, Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens, *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 380-385.
- Lau A, Stanley K, Sorrel T, 2013, Multiplex-tandem PCR for fungal diagnostics, *Methods in Molecular Biology*, 968, 195-201.
- Lepak A, Andes D, 2011, Fungal Sepsis: Optimizing Antifungal Therapy in the Critical Care Setting. *Critical Care Clinics*, 27, 123-147.
- Lopez-Martinez R, 2010, Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology*, 28, 178-184.
- Luo G, Mitchell TG, 2002, Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures using multiplex PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2860-2865.
- Maiwald M, Kappe R, Sonntag HG, 1994, Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis, *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32, 115-122.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M, 2003, The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000, *New England Journal of Medicine*, 348, 1546-1554
- McDonald LC, Weinstein MP, Fune J, Mirrett S, Reimer LG, Reller LB, 2001, Controlled Comparison of BacT/ALERT FAN Aerobic Medium and BACTEC Fungal Blood Culture Medium for Detection of Fungemia, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 622-624.
- Meyer MH, Letscher BV, Jaulhac B, Waller J, Candolfi E, 2004, Comparison of Mycosis IC/F and plus Aerobic/F media for diagnosis of fungemia by the bactec 9240 system, *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 773-777.
- Mirhendi H, Arendrup MC, 2009, Differentiating of *Candida glabrata*, *C. bracarensis* and *C. nivariensis* based on fragment length polymorphism of ITS1-ITS2 and restriction fragment length polymorphism (RFLP) of 26SrDNA(D1D2) regions, *Mycoses*, 52, 50-50.
- Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H, 2006, A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species, *Japanese Journal of Medical Mycology*, 47, 225-229.
- Mokhtari W, Nsaibia S, Gharbi A, Aouni M, 2013, Real-time PCR using SYBR Green for the detection of *Shigella* spp. in food and stool samples, *Molecular and Cellulal Probes*, 27, 53-59.

- Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, 1997, Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model, *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 995-998.
- Mousavi SA, Khalesi E, Bonjar GH, Aghighi S, Sharifi F, Aram F, 2007, Rapid molecular diagnosis for *Candida* species using PCR-RFLP, *Biotechnology*, 6, 583-587.
- Niesters HG, Goessens WH, Meis JF, Quint WG, 1993, Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species, *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 904-910.
- Nosek J, Tomaska L, Rycowska A, Fukugara H, 2002, Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*, *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1283-1289.
- Opel KL, Chung D, McCord BR, 2010, A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR, *Journal of Forensic Science*, 55, 25-33.
- Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Bennett J, Kullberg BJ, 2002, Deeply invasive candidiasis, *Infectious Disease Clinics of North America*, 16, 821-835.
- Pasligh J, Radecke C, Fleischhacker M, Ruhnke M, 2010, Comparison of Phenotypic Methods for the Identification of *Candida dubliniensis*, *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 43, 147-154.
- Pfaller MA, Diekema DJ, 2007, Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem, *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 133-163.
- Powell HA, Gooding CM, Garrett SD, Lund BM, Mckee RA, 1994, Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction, *Letters in Applied Microbiology*, 18:1, 59-61.
- Pramateftaki PV, Lanaridis P, Typas MA, 2000, Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece, *Journal of Applied Microbiology*, 89, 236-248.
- Reiss E i wsp, 1998. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections, *Medical Mycology*, 36, 249-257.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT, 1997, Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, *Analytical Biochemistry*, 245, 154-160.
- Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF, 1992, Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions, *International Journal of Food Microbiology*, 17, 37-45.
- Sakai T, Kohzaki K, watanabe A, Tsuneoka H, Shimadzu M, 2012, Use of DNA microarray analysis in diagnosis of bacterial and fungal endophthalmitis, *Clinical Ophthalmology*, 6, 321-326.

- Saulnier P, Andremont A, 1992, Detection of genes in feces by booster polymerase chain reaction, *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2080-2083.
- Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B, 2007, Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens, *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 906-914.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R, 2012, PCR inhibitors - occurrence, properties and removal, *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1014-1026.
- Selvarangan R, Limaye AP, Cookson BT, 2002, Rapid identification and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dublinensis* by capillary-based amplification and fluorescent probe hybridization, *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4308-4312.
- Slade E, Tamber PS, Vincent JL, 2003, The Surviving Sepsis Campaign: raising awareness to reduce mortality, *Critical Care Medicine*, 7, 1-2.
- Souza AC, Ferreira RC, Goncalves SS, Quindos G, Eraso E, Bizerra FC, Briones MR, Colombo AL, 2012, Accurate identification of *Candida parapsilosis* (*sensu lato*) by use of mitochondrial DNA and real-time PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 2310-2314.
- Śpibida M, Krawczyk B, Olszewski M, Kur J, 2016, Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting, *Journal of Applied Genetics*, Epub ahead of print.
- Straub TM, Pepper IL, Gerba CP, 1995, Removal of PCR inhibiting substances in sewage sludge amended soil, *Water Science and Technology*, 5-6, 311-315.
- Sultovic D, Gamulin S, Definis-Gojanovic M, Gugic D, Andjelinovic S, 2008, Interaction of humic acids with human DNA: proposed mechanisms and kinetics, *Electrophoresis*, 29, 1467-1472.
- Takeichi i wsp., 2013, Impact of next generation sequencing on diagnostics in a genetic skin disease clinic, *Experimental Dermatology*, 22, 825-831.
- Trama JP, Mordechai E, Adelson ME, 2005, Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing, *Molecular and Cellular Probes*, 19, 145-152.
- Tromley HA, McKay ZA, Christensen DR, Koehler JW, Devins MT, 2013, Evaluation of inhibitor-resistant real-time PCR methods for diagnostics in clinical and environmental samples, *PLoS One*, 8, e73845.
- Trtkova J, Raclavsky V, 2006, Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts, *Biomedical Papers of Medical Faculty of University Palacky Olomouc*, 150, 51-61.
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D, 2006, *Critical Care Medicine*, 34, 344-353.
- Wilson IG, 1997, Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification, *Applied Environmental Microbiology*, 63, 3741,3751.

- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB, 2004, Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Disease*, 39, 309–317.
- Wu JJ, Pang KR, Huang DB, Tyring SK, 2004, Therapy of systemic fungal infections, *Dermatol Ther*, 17, 532-538.
- Xu HX, Kawamura Y, Li N, Zhao LC, Li TM, Li ZY, Shu SN, Ezaki T, 2000, A rapid method for determining the G+C content of bacterial chromosomes by monitoring fluorescence intensity during DNA denaturation in a capillary tube, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1463–1469.
- Yokoyama K, Biswas SK, Miyaji M, Nishimura K, 2000, Identification and Phylogenetic Relationship of the Most Common Pathogenic *Candida* Species Inferred from Mitochondrial Cytochrome b Gene Sequences, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4503-4510.
- Yong PV, Chong PP, Lau LY, Yeoh RS, Jamal F, 2008, Molecular identification of *Candida orthopsilosis* isolated from blood culture, *Mycopathologia*, 165, 81-87.

8. Wykaz stosowanych skrótów

A - adenina

API - *Analytical Profile Index*

ATCC - *American Type Culture Collection*

BSA - albumina osocza bydlęcego (*bovine serum albumin*)

C - cytozyna

Ct - cykl w reakcji *real-time* PCR, w którym krzywa fluorescencji przecina krzywą odcięcia (*threshold cycle*)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

EDTA - kwas wersenowy

FISH - fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (*Fluorescence In Situ Hybridization*)

G - guanina

ITS - *Internal Transcribed Spacer*

j.t.k. - jednostki tworzące kolonie

MALDI TOF - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight*

mtDNA - mitochondrialne DNA

NAC - *non albicans Candida*

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (*Polymerase Chain Reaction*)
 PNA - kwas peptydonukleinowy (*Peptide Nucleic Acid*)
 pz. - pary zasad
 rDNA - rybosomalny DNA
 RNA - kwas rybonukleinowy
 rRNA - rybosomalny RNA
 T - tymina
 t-RFLP - polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (*terminal Restriction Fragments Length Polymorphism*)
 tRNA - transporujący (transferowy) RNA
 UV - promieniowanie ultrafioletowe (*Ultraviolet*)

9. Spis tabel

Tabela 1	Miejsca najczęstszego występowania grzybów z rodzaju <i>Candida</i> nienależących do gatunku <i>C. albicans</i>	9
Tabela 2	Miejsce/rodzaj infekcji wywoływanych przez poszczególne gatunki grzybów z rodzaju <i>Candida</i>	10
Tabela 3	Aktywność antymikotyczna najczęściej stosowanych leków wobec drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i> („-,-brak aktywności, „+/-,-niska aktywność, „+”-średnia aktywność, „++”-dobra aktywność, „N”-brak danych).....	15
Tabela 4	Sugerowane do pobrania objętości krwi od niemowląt, dzieci i dorosłych.....	17
Tabela 5	Rodzaje podłoży hodowlanych w systemach BacT/ALERT®.....	18
Tabela 6	Schemat pobierania i posiewów próbek krwi pobranych od chorych hospitalizowanych z podejrzeniem kandydemii - zgodnie z procedurami obowiązującymi w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.....	23
Tabela 7	Identyfikacja gatunkowa grzybów z rodzaju <i>Candida</i> spp. na podłożu chromogennym Agar <i>Candida</i> ID (bioMérieux).....	26
Tabela 8	Wady i zalety klasycznych testów diagnostycznych.....	28
Tabela 9	Przykładowe metody molekularne do identyfikacji <i>Candida</i>	29
Tabela 10	Wykaz szczepów referencyjnych używanych do badań.....	47
Tabela 11	Wykaz szczepów bakterii.....	47
Tabela 12	Wykaz klinicznych szczepów drożdżaków.....	48
Tabela 13	Wykaz starterów oligonukleotydowych.....	51
Tabela 14	Skład mieszaniny w reakcji touchdown PCR do wykrywania pan- <i>Candida</i>	54
Tabela 15	Profil temperaturowo-czasowy reakcji touchdown PCR do wykrywania pan- <i>Candida</i>	55
Tabela 16	Skład mieszaniny reakcyjnej do wykrywania pan- <i>Candida</i> za pomocą reakcji real-time PCR.....	55
Tabela 17	Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR do wykrywania pan- <i>Candida</i>	56
Tabela 18	Skład mieszaniny reakcyjnej dla układu diagnostycznego opartego o metodę t-RFLP.....	56
Tabela 19	Profil temperaturowo-czasowy reakcji dla układu diagnostycznego opartego o metodę t-RFLP.....	56
Tabela 20	Skład mieszanin reakcyjnych do trawienia restrykcyjnego produktów reakcji PCR.....	56
Tabela 21	Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji 5 celów molekularnych w reakcji multipleks PCR.....	57
Tabela 22	Profil temperaturowo-czasowy reakcji multipleks PCR do wykrywania 5 gatunków <i>Candida</i>	57

Tabela 23	Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do identyfikacji gatunkowej pięciu drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i> za pomocą real-time PCR.....	57
Tabela 24	Profil temperaturowo-czasowy reakcji Real-time PCR do identyfikacji gatunkowej <i>Candida</i>	58
Tabela 25	Analiza sekwencji nukleotydowej genów syntazy homocytrynianowej dla poszczególnych gatunków drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i>	61
Tabela 26	Zalecane parametry starterów oligonukleotydowych do reakcji PCR.....	63
Tabela 27	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla starterów LysF, LysR1 oraz LysR2.....	63
Tabela 28	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu homodimer dla starterów LysF, LysR1 oraz LysR2.....	64
Tabela 29	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami LysF i LysR1.....	65
Tabela 30	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami LysF i LysR2.....	66
Tabela 31	Skład mieszaniny do reakcji PCR na matrycy genomowego DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 z wykorzystaniem starterów LysF i LysR1.....	67
Tabela 32	Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR na matrycy genomowego DNA <i>C. albicans</i> ATCC90029 z wykorzystaniem starterów LysF i LysR1 - gradient temperatury przyłączania starterów.....	68
Tabela 33	Skład mieszaniny do reakcji PCR na z wykorzystaniem starterów LysF i LysR2.....	71
Tabela 34	Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR z wykorzystaniem starterów LysF i LysR2 - gradient temperatury przyłączania starterów.....	71
Tabela 35	Profil temperaturowo-czasowy reakcji <i>touchdown</i> PCR.....	72
Tabela 36	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla startera SynReal.....	74
Tabela 37	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu homodimer dla startera SynReal.....	75
Tabela 38	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami LysF i SynReal.....	75
Tabela 39	Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej z wykorzystaniem starterów LysF oraz SynReal.....	76
Tabela 40	Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR z wykorzystaniem starterów LysF oraz SynReal.....	76
Tabela 41	Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej za pomocą <i>real-time</i> PCR.....	77
Tabela 42	Profil temperaturowo-czasowy reakcji <i>real-time</i> PCR do amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej.....	77
Tabela 43	Temperatury topnienia amplikonów w reakcji pan- <i>Candida real-time</i> PCR.....	79
Tabela 44	Teoretyczne wielkości produktów po trawieniu amplikonów w metodzie t-RFLP, liczby wyrażają długość fragmentów restrykcyjnych [pz].....	86
Tabela 45	Skład mieszaniny reakcyjnej dla układu diagnostycznego opartego o metodę t-RFLP.....	87
Tabela 46	Profil temperaturowo-czasowy reakcji dla układu diagnostycznego opartego o metodę t-RFLP.....	87
Tabela 47	Specyficzność reakcji PCR oraz <i>real-time</i> PCR do identyfikacji pan- <i>Candida</i>	89
Tabela 48	Czułość reakcji diagnostycznych do wykrywania pan- <i>Candida</i>	89
Tabela 49	Analiza sekwencji nukleotydowej genu akonitazy.....	96
Tabela 50	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla starterów AcoF i AcoR.....	96
Tabela 51	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu selfdimer dla starterów AcoF i AcoR.....	97
Tabela 52	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami AcoF i AcoR.....	98
Tabela 53	Skład mieszaniny reakcyjnej do optymalizacji buforu reakcyjnego do amplifikacji fragmentu genu akonitazy.....	99
Tabela 54	Profil temperaturowo-czasowy optymalizacji temperatury przyłączania starterów w reakcji PCR do amplifikacji fragmentu genu akonitazy.....	99

Tabela 55	Skład mieszaniny reakcyjnej do optymalizacji stężenia starterów w reakcji amplifikacji fragmentu genu akonitazy.....	100
Tabela 56	Zoptymalizowany profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR do amplifikacji fragmentu genu akonitazy.....	101
Tabela 57	Skład zoptymalizowanej mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu akonitazy.....	102
Tabela 58	Specyficzność układu do identyfikacji <i>C. albicans</i>	102
Tabela 59	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla starterów EnoF i EnoR.....	103
Tabela 60	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu self-dimer dla starterów EnoF i EnoR.....	104
Tabela 61	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami EnoF i EnoR.....	105
Tabela 62	Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu enolazy.....	106
Tabela 63	Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR do optymalizacji temperatury hybrydizacji starterów dla amplifikacji fragmentu genu enolazy.....	106
Tabela 64	Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu enolazy.....	107
Tabela 65	Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR do amplifikacji fragmentu genu enolazy.....	107
Tabela 66	Specyficzność układu do identyfikacji <i>C. krusei</i>	107
Tabela 67	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla starterów TropF i TropR.....	108
Tabela 68	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu selfdimer dla starterów TropF i TropR.....	109
Tabela 69	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami TropF i TropR.....	110
Tabela 70	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla starterów GlaF i GlaR.....	110
Tabela 71	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu selfdimer dla starterów GlaF i GlaR.....	111
Tabela 72	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami GlaF i GlaR.....	112
Tabela 73	Skład mieszanin reakcyjnych do amplifikacji fragmentów genu <i>trf4</i> specyficznych dla <i>C. tropicalis</i> i <i>C. glabrata</i>	113
Tabela 74	Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR do optymalizacji temperatury hybrydizacji fragmentów genu <i>trf4</i> dla <i>C. tropicalis</i> i <i>C. glabrata</i>	113
Tabela 75	Skład mieszanin reakcyjnych do amplifikacji fragmentów genu <i>trf4</i> - badanie specyficznosci.....	114
Tabela 76	Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR do amplifikacji fragmentów genu <i>trf4</i>	115
Tabela 77	Specyficzność układów do identyfikacji <i>C. glabrata</i> i <i>C. tropicalis</i>	115
Tabela 78	Najbardziej prawdopodobne oddziaływania starterów w reakcji multipleks PCR.....	116
Tabela 79	Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji 5 celów molekularnych w reakcji multipleks PCR.....	118
Tabela 80	Profil temperaturowo-czasowy reakcji multipleks PCR do wykrywania 5 gatunków <i>Candida</i>	118
Tabela 81	Specyficzność układu multipleks PCR.....	119
Tabela 82	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla startera AcoReal.....	122
Tabela 83	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu selfdimer dla startera AcoReal.....	122
Tabela 84	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami AcoF i AcoRealR.....	123
Tabela 85	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu "szpilki do włosów" dla starterów ParRealF i ParRealR.....	123
Tabela 86	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu selfdimer dla starterów ParRealF i ParRealR.....	124
Tabela 87	Analiza występowania najbardziej prawdopodobnych struktur typu heterodimer pomiędzy oligonukleotydami ParRealF i ParRealR.....	125

Tabela 88	Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do identyfikacji gatunkowej pięciu drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i> za pomocą <i>real-time</i> PCR.....	126
Tabela 89	Profil temperaturowo-czasowy reakcji <i>real-time</i> PCR do identyfikacji gatunkowej <i>Candida</i>	126
Tabela 90	Temperatury topnienia amplikonów w reakcji <i>real-time</i> PCR dla poszczególnych gatunków <i>Candida</i>	130
Tabela 91	Stężenie starterów w reakcji typu dupleks <i>real-time</i> PCR do identyfikacji <i>C. tropicalis</i> i <i>C. parapsilosis</i>	132
Tabela 92	Stężenie starterów w reakcji dupleks <i>real-time</i> PCR do identyfikacji <i>C. albicans</i> i <i>C. krusei</i>	133
Tabela 93	Stężenie starterów w reakcji tripleks <i>real-time</i> PCR do wykrywania <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> i <i>C. krusei</i>	134
Tabela 94	Wyniki hodowli na podłożach chromogennych w kierunku identyfikacji gatunkowej <i>Candida</i>	138
Tabela 95	Wynik identyfikacji drożdżaków izolowanych z materiałów klinicznych za pomocą opracowanych układów diagnostycznych.....	140
Tabela 96	Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA.....	147
Tabela 97	Profil temperaturowo-czasowy reakcji <i>Real-time</i> PCR do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA.....	148
Tabela 98	Skład mieszaniny reakcyjnej do ustalenia jednostkowości polimerazy OmniKlenTaq.....	149
Tabela 99	Skład mieszaniny reakcyjnej dla seryjnych rozcieńczeń polimerazy TaqNova.....	150
Tabela 100	Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA z rozcieńczoną polimerazą OmniKlenTaq w gradiencie stężeń krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej.....	151
Tabela 101	Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA z polimerazą TaqNova w gradiencie stężeń krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej.....	152
Tabela 102	Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA w gradiencie polimerazy OmniKlenTaq dla różnych stężeń krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej.....	153
Tabela 103	Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA w gradiencie stężenia BSA i 30% krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej.....	154
Tabela 104	Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA z polimerazą TaqNova w gradiencie stężeń krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej.....	155
Tabela 105	Skład mieszaniny reakcyjnej do identyfikacji <i>C. albicans</i> bezpośrednio z pozytywnej hodowli krwi.....	158
Tabela 106	Opracowane układy diagnostyczne do identyfikacji drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i>	160

10. Spis rycin

Rycina 1	Zasada detekcji grzybów z rodzaju <i>Candida</i> w próbkach krwi - system BacT/ALERT® 3D (rysunek własny).....	19
Rycina 2	Wykres krzywej zależności zmian reflektancji próby w czasie i trzy prawdopodobne algorytmy wzrostu mikroorganizmów w próbkach krwi - system BacT/ALERT® 3 D.....	20
Rycina 3	Krzywa zależności zmian reflektancji próby w czasie, o kształcie krzywej wzrostu dla dodatniego posiewu krwi (62 h 9 min), gdzie izolowanym czynnikiem etiologicznym była <i>Candida glabrata</i> ; wzrost jednostek reflektancji z 2910 do 3450.....	21
Rycina 4	Krzywa zależności zmian reflektancji próby w czasie, o kształcie krzywej wzrostu dla dodatniego posiewu krwi (72 h 20 min) gdzie izolowanym czynnikiem etiologicznym była <i>Candida glabrata</i> ; wzrost jednostek reflektancji z 2803 do 3358.....	21
Rycina 5	Wykrywalność poszczególnych gatunków grzybów z rodzaju <i>Candida</i> z próbek krwi.....	22



Rycina 6	Komórki <i>Candida albicans</i> preparat mikroskopowy b. Grama x 1000 pow. [zdj. własne].....	24
Rycina 7	Komórki <i>Candida krusei</i> preparat mikroskopowy b. Grama x 1000 pow. [zdj. własne].	24
Rycina 8	Forma inwazyjna <i>Candida albicans</i> (pseudomycelia) – materiał kliniczny: płyn z jamy brzusznej. Preparat barwiony metodą Grama; pow. x 1000, mikroskop Olympus [zdj. własne].....	24
Rycina 9	Kolonie <i>Candida</i> spp. wzrost na podłożu Sabourauda. Hodowla 48 godzinna w temp. 30°C [zdj. własne].....	25
Rycina 10	Kolonie <i>Candida krusei</i> wzrost na podłożu Sabourauda. Hodowla 48 godzinna w temp. 30°C [zdj. własne].....	25
Rycina 11	Schemat operonu <i>rrn</i> i miejsc hybrydyzacji starterów do identyfikacji gatunkowej grzybów.	31
Rycina 12	Schemat reakcji <i>nested</i> PCR przeprowadzanej w jednej mieszaninie reakcyjnej.....	35
Rycina 13	Techniki wykorzystywane do identyfikacji patogenów z próbek krwi.	45
Rycina 14	Schemat reakcji katalizowanej przez syntazę homocytrynianową.	59
Rycina 15	Schemat tworzenia układów diagnostycznych opartych o sekwencje genu syntazy homocytrynianowej.....	60
Rycina 16	Miejsce hybrydyzacji startera LysF. Każdy z wierszy odpowiada jednej sekwencji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej pochodzącej z bazy NCBI GenBank dostępnymi pod numerami przedstawionymi z lewej strony.....	62
Rycina 17	Miejsce hybrydyzacji startera LysR1. Każdy z wierszy odpowiada jednej sekwencji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej pochodzącej z bazy NCBI GenBank dostępnymi pod numerami przedstawionymi z lewej strony.....	62
Rycina 18	Miejsce hybrydyzacji startera LysR2. Każdy z wierszy odpowiada jednej sekwencji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej pochodzącej z bazy NCBI GenBank dostępnymi pod numerami przedstawionymi z lewej strony.....	62
Rycina 19	Obraz rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów optymalizacji reakcji PCR z zastosowaniem gradientu temperatury przyłączania starterów LysF i LysR1. M.-marker wielkości DNA 100-1000, 1-56°C, 2-56,7°C, 3-57,5°C, 4-58,5°C, 5-59,6°C, 6-60,8°C, 7-62°C, 8- 63°C, 9-63,9°C, 10. K.....	68
Rycina 20	Obraz rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów optymalizacji reakcji PCR z zastosowaniem gradientu stężeń jonów magnezu z wykorzystaniem starterów LysF i LysR1. M.-marker wielkości DNA 100-1000, 1-1mM Mg ²⁺ , 2-1,5mM Mg ²⁺ , 3-2mM Mg ²⁺ , 4-2,5mM Mg ²⁺ , 5-3mM Mg ²⁺ , 6-3,5mM Mg ²⁺ , 7-4mM Mg ²⁺ , 8-4,5mM Mg ²⁺	69
Rycina 21.	Obraz rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów reakcji amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej z wykorzystaniem starterów LysF i LysR1 z zastosowaniem zoptymalizowanych warunków reakcji PCR. M-marker wielkości DNA 100-1000, 1-10- szczepy kliniczne <i>C. albicans</i>	69
Rycina 22	Obraz rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów reakcji amplifikacji fragmentu genu <i>Lys21</i> z zastosowaniem gradientu temperatury przyłączania starterów: 1-56 °C, 2-57,1 °C, 3-58,4 °C, 4-59,8°C, 5-61,3 °C, 6-62,7 °C, 7-64,1°C, 8-65,6 °C, 9-70,0° C. M.-marker wielkości DNA 100-1000 A - <i>C. guilliermondii</i> , B - <i>C. albicans</i> , C - <i>C. krusei</i> , D - <i>C. glabrata</i> , E - <i>C. parapsilosis</i> , F - <i>C. tropicalis</i> , G - <i>C. kefyr</i>	71
Rycina 23	Obraz rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów reakcji amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej z zastosowaniem touchdown PCR. M.-marker wielkości DNA 500-1000, 1- <i>C. albicans</i> , 2- <i>C. krusei</i> , 3- <i>C. parapsilosis</i> , 4- <i>C. kefyr</i> , 5- <i>C. glabrata</i> , 6- <i>C. guilliermondii</i> , 7- <i>C. tropicalis</i> , 8.-K...	73
Rycina 24	Miejsce hybrydyzacji startera SynReal. Każdy z wierszy odpowiada jednej sekwencji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej pochodzącej z bazy NCBI GenBank dostępnymi pod numerami przedstawionymi z lewej strony.....	74
Rycina 25	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów PCR z zastosowaniem starterów LysF oraz SynReal. M- marker wielkości 100-1000, 1 -5 - referencyjne szczepy <i>Candida</i> : odpowiednio <i>Candida albicans</i> ATCC90029, <i>Candida glabrata</i> ATCC2001, <i>Candida parapsilosis</i> ATCC22019, <i>Candida tropicalis</i> ATCC750, <i>Candida krusei</i> ATCC6258, 6 - kontrola ujemna reakcji PCR.....	77

Rycina 26	Wynik amplifikacji fragmentu genu syntazy homocytrynianowej dla pięciu klinicznie istotnych gatunków <i>Candida</i> z wykorzystaniem reakcji <i>real-time</i> PCR.....	78
Rycina 27.	Krzywe topnienia produktów reakcji <i>real-time</i> PCR z wykorzystaniem genu syntazy homocytrynianowej dla <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i>	79
Rycina 28	Schemat metody t-RFLP 1-etap przygotowania reakcji PCR, 2-etap amplifikacji i trawienia, 3-etap rozdziału i wizualizacji produktów trawienia.....	81
Rycina 29	Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI dla <i>C. albicans</i> ATCC 90029. Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu <i>RsaI</i> , natomiast na pomarańczowo miejsce rozpoznania dla enzymu <i>DraI</i>	83
Rycina 30	Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI dla <i>C. tropicalis</i> ATCC 750. Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu <i>RsaI</i> , na pomarańczowo miejsce rozpoznania dla enzymu <i>DraI</i> , natomiast na niebiesko dla enzymu <i>BglII</i>	83
Rycina 31	Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI dla <i>C. glabrata</i> ATCC 2001. Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu <i>RsaI</i>	84
Rycina 32	Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI <i>C. dubliniensis</i> CD36. Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu <i>RsaI</i> , na pomarańczowo miejsce rozpoznania dla enzymu <i>DraI</i> , natomiast na niebiesko dla enzymu <i>BglII</i>	84
Rycina 33	Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019. Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu <i>RsaI</i> , na niebiesko dla enzymu <i>BglII</i>	85
Rycina 34	Analiza sekwencji fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dostępnych w bazie NCBI dla <i>C. krusei</i> . Czerwoną ramką zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów, zieloną miejsce rozpoznania dla enzymu <i>RsaI</i> , na pomarańczowo miejsce rozpoznania dla enzymu <i>DraI</i>	86
Rycina 35	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 12% żelu poliakrylamidowym produktów trawienia fragmentów genu syntazy homocytrynianowej dla referencyjnych szczepów <i>Candida</i> , ND-nietrawiony produkt amplifikacji.	87
Rycina 36	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 12% żelu poliakryloamidowym produktów trawienia fragmentów genu syntazy homocytrynianowej, dla szczepu referencyjnego <i>C. glabrata</i> ATCC 2001 i klinicznych szczepów <i>C. glabrata</i> (Cg1-Cg5) ND-nietrawiony produkt amplifikacji.	88
Rycina 37	Schemat teoretycznego etapu projektowania układu multipleks PCR.....	94
Rycina 38	Schemat optymalizacji układu multipleks PCR.	95
Rycina 39	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,0 % żelu agarozowym produktów reakcji PCR w gradiencie temperatury przyłączania starterów z wykorzystaniem buforów reakcyjnych z KCl i NH ₄ SO ₄ . M-marker wielkości DNA 1kb (Fermentas), Ścieżki od 1 do 4 -oznaczają odpowiednio temperatury: 69 °C, 70 °C, 71 °C, 72°C. ścieżka nr 5 oznacza kontrolę ujemną reakcji PCR. K oznacza bufor z KCl, natomiast N z NH ₄ Cl.	100
Rycina 40	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2 % żelu agarozowym produktów reakcji PCR w gradiencie stężenia starterów. M – marker wielkości DNA 1kb (Fermentas), ścieżka nr 1 - kontrola ujemna, ścieżki 2, 3, 4, 5 oznaczają odpowiednio ilości każdego ze starterów w mieszaninie reakcyjnej: 5 pmoli, 10 pmoli, 15 pmoli , 20 pmoli	101
Rycina 41	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2 % żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu enolazy w gradiencie temperatury hybrydyzacji starterów. M-marker wielkości 100-1000, ścieżki 1-9 temperatury przyłączania starterów odpowiednio: 55 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 10-kontrola ujemna.	106
Rycina 42	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2 % żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu <i>trf4</i> w gradiencie temperatury hybrydyzacji starterów	

	GlaF i GlaR. M-marker wielkości 100-3000, ścieżki 1-8 temperatury przyłączana starterów odpowiednio: 55 °C, 57 °C, 59 °C, -61 °C, 63 °C, 65 °C, 67 °C, 70 °C, 9-kontrola negatywna.....	113
Rycina 43	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu <i>trf4</i> w gradiencie temperatury hybrydyzacji starterów TropF i TropR. M-marker wielkości 100-1000, ścieżki 1-5 temperatury przyłączania starterów odpowiednio: 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, 71 °C.....	114
Rycina 44	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji reakcji multipleks PCR. M-marker wielkości 100-1000, 1-kontrola ujemna, 2- <i>C.parapsilosis</i> , 3- <i>C.albicans</i> , 4- <i>C. tropicalis</i> , 5- <i>C. krusei</i> , 6- <i>C. glabrata</i> 7-DNA izolowane z hodowli 5 wykrywanych gatunków <i>Candida</i>	119
Rycina 45	Wynik amplifikacji w układzie <i>real-time</i> PCR oraz profil topnienia amplicjonu dla <i>C. parapsilosis</i>	127
Rycina 46	Wynik amplifikacji w układzie <i>real-time</i> PCR oraz profil topnienia amplicjonu dla <i>C. albicans</i>	127
Rycina 47	Wynik amplifikacji w układzie <i>real-time</i> PCR oraz profil topnienia amplicjonu dla <i>C. krusei</i>	128
Rycina 48	Wynik amplifikacji w układzie <i>real-time</i> oraz profil topnienia amplicjonu dla <i>C. glabrata</i>	129
Rycina 49	Wynik amplifikacji w układzie <i>real-time</i> oraz profil topnienia amplicjonu dla <i>C. tropicalis</i>	129
Rycina 50	Analiza krzywych topnienia amplicjonów powstałych w reakcji dupleks <i>real-time</i> PCR z wykorzystaniem starterów ParRealF, ParRealR, TropF oraz TropR.....	132
Rycina 51	Analiza krzywych topnienia amplicjonów powstałych w reakcji dupleks <i>real-time</i> PCR z wykorzystaniem starterów AcoF, AcoReal, EnoF oraz EnoR.....	133
Rycina 52	Analiza krzywych topnienia amplicjonów powstałych w reakcji tripleks <i>real-time</i> PCR z wykorzystaniem starterów TropF, TropR, ParRealF, ParRealR, EnoF oraz EnoR.....	134
Rycina 53	Schemat procedury diagnostycznej identyfikacji gatunkowej pozytywnych posiewów krwi oraz innych materiałów klinicznych.....	137
Rycina 54	Wynik identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju <i>Candida</i> (<i>C. glabrata</i>) - karta Vitek® 2 YST ID/ Vitek® 2 kompakt (bioMérieux) [zdj. własne].....	139
Rycina 55	Wynik identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju <i>Candida</i> (<i>C. glabrata</i>) - karta Vitek® 2 YST ID/ Vitek® 2 kompakt (bioMérieux) [zdj. własne].....	139
Rycina 56	Czas identyfikacji gatunkowej drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i> w 4 wariantach procedur diagnostycznych.....	145
Rycina 57	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA w gradiencie stężenia krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej M-Marker wielkości 100-1000, ścieżki 1-5 wzrastające stężenie krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej odpowiednio: 1-0%, 2-5%, 3-10%, 4-25%, 5-40%.....	148
Rycina 58	Schemat przygotowania dwukrotnych seryjnych rozcieńczeń polimerazy w mieszaninach reakcyjnych.....	149
Rycina 59	Wynik rozdziału elektroforetycznego w ...% żelu agarozowym produktów reakcji amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA z zastosowaniem gradientu polimerazy TaqNova oraz OmniKlenTaq M-marker wielkości 100-1000, 1-8 seryjne dwukrotne rozcieńczenia polimerazy A-TaqNova B-OmniKlenTaq.....	150
Rycina 60	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA dla seryjnych rozcieńczeń polimerazy TaqNova oraz 30 krotnie rozcieńczonej OmniKlenTaq M-marker wielkości 500-6000, ścieżki 1-4 seryjne 2-krotne rozcieńczenia polimeraz: A-TaqNova, B-30x OmniKlenTaq.....	151
Rycina 61	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA w gradiencie stężenia krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej z zastosowaniem 1U polimerazy TaqNova (A) i OmniKlenTaq (B) w 25 µl mieszaniny reakcyjnej M-marker wielkości 500-6000 ścieżki 1-5 gradient stężenia krwi pełnej: 0%, 10%, 20%, 30%, 40%.....	152
Rycina 62	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów reakcji amplifikacji w obecności różnej zawartości krwi pełnej w mieszaninie reakcyjnej	

	A-0% B-10% C-20% D-30%, M-marker wielkości 1kb Fermentas, ścieżki 1-8 odpowiadają różnemu stężeniu polimerazy OmniKlenTaq w mieszaninie reakcyjnej odpowiednio: 1-1,2; 2-0,6; 3-0,3; 4-0,15; 5-0,075; 6-0,04; 7-0,02; 8-0,01 [U/μl]... 153
Rycina 63	Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA przy stężeniu krwi w mieszaninie reakcyjnej 30%-A i 0%-B w gradiencie stężenia BSA z zastosowaniem granicznego stężenia polimerazy OmniKlenTaq skutkujący inhibicją reakcji PCR przy 30% krwi, M-marker wielkości 100-500, ścieżki odpowiadają gradientowi stężenia BSA: 1-0, 2-0,04, 3-0,08, 4-0,12, 5-0,16, 6-0,2, 7-0,24 [mg/ml]..... 154
Rycina 64	Wynik rozdziału elektroforetycznego w 1,2% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu genu 18S rDNA w przypadku A-30% i B-0% krwi w mieszaninie reakcyjnej z zastosowaniem gradientu stężenia polimerazy TaqNova, M-marker wielkości 100-1000, ścieżki odpowiadają stężeniu polimerazy: 1-2,4; 2-1,2; 3-0,6; 4-0,3; 5-0,15; 6-0,075; 7-0,04; 8-0,02; 9-0,01 [U/μl]..... 156
Rycina 65	Schemat postępowania w celu przygotowania próbki pochodzącej z pozytywnej hodowli krwi z butelki hodowlanej BactAlert® do identyfikacji gatunkowej za pomocą reakcji <i>rel-time</i> PCR..... 157
Rycina 66	A- Wynik amplifikacji przeprowadzonej w kierunku identyfikacji <i>C. albicans</i> z pozytywnej próbki krwi, B-krzywe topnienia ampliconów. 158