

původní práce

RYCHLÝ ZÁCHYT INVAZIVNÍ MYKOTICKÉ INFEKCE S VYUŽITÍM METODY POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE U DĚTÍ SE ZHOUBNÝM NÁDOROVÝM ONEMOCNĚNÍM

RAPID DETECTION OF INVASIVE MYCOTIC INFECTION USING POLYMERASE CHAIN REACTION IN CHILDREN WITH CANCER

MICHÁLEK J.¹, HORVÁTH R.², DENDIS M.², BENEDÍK J.²

¹ 1. DĚTSKÁ INTERNÍ A ONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

² CENTRUM KARDIOVASKULÁRNÍ A TRANSPLANTAČNÍ CHIRURGIE, BRNO

Souhrn: Výchozísk: Včasná diagnostika a léčba mykotické infekce může zabránit diseminaci a rozvoji orgánového poškození u imunosuprimovaného onkologického pacienta. **Soubor pacientů a metody:** V souboru 24 dětí ve věku 1-18 let s nádorovým onemocněním a febrilní neutropenií byl sledován výskyt invazivní mykotické infekce klasickými kultivačními metodami v kombinaci s vyšetřením přítomnosti houbové DNA metodou polymerázové řetězové reakce. **Výsledky:** Přítomnost houbové DNA v krvi byla nalezena v průběhu 11 epizod febrilní neutropenie u 10 pacientů, přičemž hemokultivace (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*) byla pozitivní pouze v 5 z 11 PCR pozitivních epizod febrilní neutropenie. U jednoho pacienta s abscedující bronchopneumonií došlo ke vzniku aspergilomy pravé plicy potvrzeného histologicky i metodou PCR. **Závěry:** Vyšetření přítomnosti houbové DNA v krvi je spolehlivou, rychlou a vysoce citlivou metodou ke zjištění invazivní mykotické infekce, která umožňuje včasné a cílené zahájení antimykotické léčby u onkologických pacientů, zejména v období febrilní neutropenie.

Klíčová slova: mykóza, febrilní neutropenie, polymerázová řetězová reakce, děti

Summary: Backgrounds: Early diagnosis and treatment of mycotic infection can prevent dissemination and systemic spread of yeasts and molds in immunocompromised cancer patient. **Design and methods:** In a group of 24 children aged 1-18 years with cancer and febrile neutropenia, the invasive mycotic infection was monitored using cultivation in combination with fungal DNA detection by polymerase chain reaction. **Results:** Fungal DNA was found in peripheral blood in 11 episodes of febrile neutropenia in 10 patients while cultivation from blood cultures (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*) was positive in only 5 out of 11 PCR-positive episodes of febrile neutropenia. The aspergilloma developed in a patient with bronchopneumonia and was confirmed by both histology and PCR. **Conclusions:** The examination of fungal DNA by polymerase chain reaction is reliable, fast and highly sensitive method for the detection of invasive mycotic infection enabling early targeted antifungal therapy in patients with cancer, especially during episodes of febrile neutropenia.

Keywords: mycosis, febrile neutropenia, polymerase chain reaction, children

Úvod

Invazivní mykotické infekce znamenají vážnou hrozbu pro onkologického pacienta léčeného imunosupresivní protinádorovou terapií (1-5). Mezi nejčastější mykotické patogeny patří rody *Candida* sp. a *Aspergillus* sp., které tvoří 66 %, respektive 30 %, všech mykotických infekcí (2,3,5). *Cryptococcus neoformans*, rody *Mucor*, *Trichosporon*, *Alternaria* a jiné houby jsou nalézány méně často (3,5-7).

I přes zavedení profylaktické léčby antimykotiky a zavedení nových metod diagnostiky mykotických infekcí (kultivačně, serologicky, průkazem specifických antigenů) u onkologických pacientů je stále asi 30 % případů invazivní mykotické infekce rozpoznáno až z nekropsie (1,6,7). Toto zjištění dokazuje, že dosavadní diagnostické možnosti nejsou k průkazu invazivní mykotické infekce dostatečné. Incidence invazivní mykotické infekce u onkologických pacientů s febrilní neutropenií (4), dokumentované kultivačně nebo serologicky, se pohybuje od 5 do 10 % (7,8). Důležitým faktorem je také délka trvání febrilní neutropenie a absolutní počet neutrofilů. Nejvíce jsou ohroženi pacienti s neutropenií trvající déle než 7 dní a s absolutním počtem neutrofilů pod

100x10⁶/l periferní krve (9). Kultivace kvasinek z hemokultur není vždy úspěšná, kultivace ostatních hub je zpravidla dlouhodobá (10,11). Serologická vyšetření u imunosuprimovaných pacientů jsou pro špatnou tvorbu protilátek málo spolehlivá (11-13), zatímco u zdravých jedinců nacházíme často vysoké titry protilátek proti *C. albicans* (12,13). K doporučovaným vyšetřením patří detekce specifických antigenů, např. imunoprecipitační analýza mananů buněčné stěny kvasinek (12). Ani senzitivita tohoto vyšetření však není vždy dostatečná při rutinní diagnóze invazivní mykotické infekce (12,13).

Zcela novým a u nás dosud zřídka používaným přístupem k diagnostice invazivních mykotických infekcí je detekce specifické sekvence houbové DNA v klinických materiálech metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) (14-16, 20). Princip této metody spočívá v amplifikaci a následné detekci sekvence DNA specifické pro určitý organismus nebo skupinu organismů. Ve zde předkládaném sdělení se jednalo o detekci specifické houbové ITS2 (internal transcribed spacer) sekvence, umožňující rychlou a přesnou diagnostiku invazivních mykotických infekcí (14). Tato sekvence se

nachází ve 40 až 80 kopiích v genomu všech hub mezi geny kódujícími 5,8S rRNA a 25S rRNA. Ačkoliv je sama sekvence ITS2 druhově vysoce specifická, použité primery ITS3 a ITS4 jsou v okolních konzervativních oblastech (18, 19). Cílem studie bylo zavedení této nové diagnostické metody a posouzení jejího přínosu v klinické praxi.

MATERIÁL A METODY

Pacienti

V průběhu 18 měsíců od září 1997 do února 1999 bylo na 1. Dětské interní a onkologické klinice léčeno 24 dětí (13 chlapců a 11 dívek) ve věku 1-18 let, které prodělaly alespoň jednu epizodu febrilní neutropenie (tělesná teplota nad 38,5 °C nebo opakovaně nad 38 °C v intervalu minimálně 4 hodin u pacienta s absolutním počtem neutrofilních granulocytů pod 500x10⁶/l periferní krve) v průběhu protinádorové léčby. Jednalo se o 15 pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií, 6 pacientů s akutní myeloidní leukémií, 1 pacienta s VAHS (virem asociovaný hemofagocytární syndrom), 1 pacienta s neuroblastomem a 1 pacienta s osteosarkomem. Při výskytu febrilní neutropenie bylo prováděno současně vyšetření hemokultur a vyšetření metodou PCR z plné krve na přítomnost houbové DNA. Odběr hemokultur byl prováděn opakovaně 2-3x při vzestupu tělesné teploty, při třesavce z centrálního venózního katétru (CVK) i z periferní krve. V případě negativního kultivačního nálezu byl znovu opakován podle klinického stavu. Odběr krve na vyšetření houbové DNA metodou PCR byl prováděn současně s prvním odběrem hemokultur z CVK i periferní krve a dále dle klinického stavu pacienta opakovaně ve 3-7 denních intervalech až do vymizení pozitivního nálezu houbové DNA v krvi.

Vyšetření metodou PCR

Izolace DNA byla provedena ze 400 µl plné krve izolačním kitem firmy *Malamité*, v.o.s.(ČR), využívající lýzy buněk detergentem a chaotropními ionty s následnou vazbou uvolněné DNA na amorfní SiO₂. DNA byla eluována do 20 µl TE pufru. Pro následnou detekci specifické houbové DNA metodou PCR bylo použito 5 µl izolátu.

Složení reakční směsi o celkovém objemu 50 µl bylo následující: 1x PCR pufr (BioVendor, ČR), 2 mM MgCl₂, 0,5% glycerol, 20 µg/ml Red Kresol (Sigma), 100 µM každého dNTP (Boehringer-Mannheim), 0,5 µM univerzálních houbově-specifických primerů ITS3 (5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3') a ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') a 2,5 U Taq rekombinantní polymeráza Taq-special (BioVendor, ČR). Reakční směs byla inkubována v termocykleru (PTC-200, MJ Research) za následujících reakčních podmínek: počáteční denaturace 96 °C / 4 min.; následuje 46 amplifikačních cyklů: 94 °C / 8 sek. (denaturace), 57 °C / 8 sek. (annealing), 72 °C / 35 sek. (extenze); finální extenze 72 °C / 2 min. Výsledný amplifikační produkt o délce okolo 330 bp byl analyzován elektroforeticky na 3% agarózovém gelu a po obarvení ethidium bromidem vizualizován UV zářením (312 nm).

V jednotlivých reakcích bylo vyšetřováno 5 µl izolátu, což představovalo ekvivalent 50 l plné periferní krve. Při vyšetření metodou PCR byla vždy prováděna *negativní izolační kontrola* (tj. reakční směs + H₂O izolovaná stejným způsobem jako vzorek), *negativní kontrola* (tj. reakční směs + sterilní H₂O), *pozitivní kontrola* (tj. reakční směs + rekombinantní plasmid pCR2.3CA, obsahující část několikakopiové sekvence ITS2 *Candida albicans*) a pro každý vzorek byla provedena *inhibiční kontrola* (tj. reakční směs + vzorek + rekombinantní plasmid pCR2.3CA). S použitím uvedené sady kontrolních reakcí byla možnost falešné negativy i falešné positivity prakticky vyloučena. Citlivost detekce byla asi 100 mikroorganismů v 1 ml klinického materiálu. Výsledky DNA vyšetření byly známy nejpozději do 24 hodin od odběru biologického materiálu.

Antimykotická profylaxe a léčba

Pacienti s akutní lymfoblastickou leukémií vysokého rizika a pacienti s akutní myeloidní leukémií dostávali profylakticky flukonazol 4-6mg/kg/den p. o. během indukční chemoterapie a v leukopenickém období po chemoterapii. Antimykotická léčba flukonazolem 10-12mg/kg/den i.v. byla zahajována neprodleně u všech pacientů s febrilní neutropenií na základě pozitivního nálezu houbové DNA metodou PCR (do 24 hodin od odběru biologického materiálu) nebo na základě pozitivního kultivačního nálezu. V případě flukonazol-rezistentních hub byla na základě kultivačního či histologického nálezu zahájena léčba amfotericinem B v obvyklé dávce (1,4).

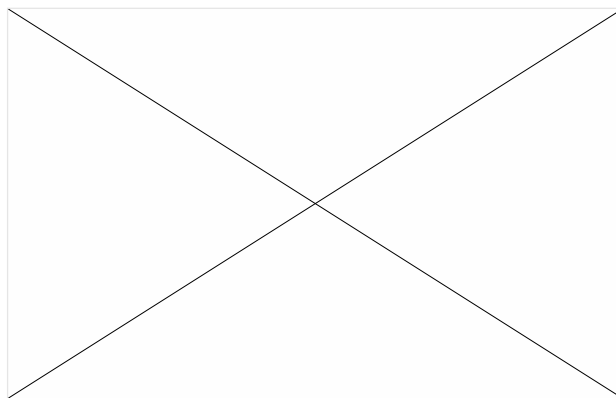
Výsledky

Ve sledovaném období bylo zachyceno celkem 20 pozitivních vzorků biologického materiálu (19 vzorků krve a 1 vzorek z abscesové dutiny biopsie plic) vyšetřovaných na přítomnost houbových patogenů metodou PCR během 11 epizod febrilní neutropenie u 10 onkologických pacientů léčených na 1. Dětské interní a onkologické klinice FN Brno (viz tab.1, Obr. 1). Kultivační vyšetření z hemokultur bylo pozitivní v 5 z 11 (45%) epizod febrilní neutropenie s PCR pozitivním nálezem houbových patogenů. U dalších dvou pacientů PCR pozitivních v krvi s negativní kultivací z hemokultury byl pozitivní kultivační nález z výtěru z krku. Ve všech kultivačních nálezech se jednalo o *Candida sp.* (viz tab.1).

U jednoho pacienta (pacient č.1, tab.1), který měl opakované pozitivní nálezy houbové DNA v krvi, došlo s odstupem 6 týdnů od skončení 16-denního období FN k rozvoji abscedující bronchopneumonie s CT nálezem aspergilomu pravé plic, který byl potvrzen histologicky z biopsie postižené plic. Také metodou PCR byl ze stejného vzorku plicní tkáně zjištěn pozitivní nález houbové DNA. U jedné pacientky byla diagnostikována plicní diseminovaná kandidóza na základě CT plic, pozitivního nálezu houbové DNA v krvi, kultivačního nálezu *C.albicans* v krvi a dobré odpovědi na léčbu flukonazolem.

Délka trvání febrilní neutropenie u pacientů s pozitivním PCR nálezem houbových patogenů se pohybovala od 2 do 16 dnů s mediánem 8 dnů. Ve třech případech se jednalo o osídlení CVK kandidami (*C. tropicalis* byla i kultivačně potvrzena u dvou pacientů) s klinickým obrazem katetrové sepsy. U všech tří pacientů byl CVK odstraněn do 24-48 hodin, z toho u dvou z těchto pacientů trvala FN pouze 2, resp. 3 dny. FN po vyjmutí infikovaného CVK trvala u všech tří pacientů maximálně 48 hodin. U ostatních pacientů došlo k fungémii v den 1-10 (medián den 8) trvání FN. U 4 pacientů byla dále kultivačně zjištěna bakteriální sepsy na počátku epizody FN (viz tab.1).

Obr. 1: Detekce univerzální mykotické sekvence ITS2 u 10 pacientů (11 epizod FN) metodou PCR podle tab. 1. Číslo na elektroforetogramu označují jednotlivé pacienty, symboly 2a, 2b označují první a druhou epizodu FN u pacienta č. 2, M označuje dráhu s velikostním standardem (velikosti fragmentů od 100 do 2000 bp), NK negativní kontrolu.



Tab. 1: Vyšetření pacientů s febrilní neutropenií s pozitivním nálezem houbové DNA metodou PCR v biologickém materiálu

Číslo pac.	Pohlaví	Věk (let)	Základní diagnóza ⁺	Délka trvání FN*(dny)	Biol. materiál**	PCR*** vyšetření z krve	Kultivační vyšetření z hemokultury	Klinický stav	Poznámka
1	M	18	osteosarkom	16	HK	D10 [§] +++ D13 ++ D57 ⁺⁺ ++	opakovaně negativní	G- sepse ^{§§} , enterocolitis D8-16; colitis D8-16; abscedující bronchopneumonie D57	<i>Aspergillus sp.</i> z biopsie plic D57
2	M	17	ALL-HR	10	HK	D5 ++ D8 ++ D10 +	D5 <i>C. albicans</i>	FN, mukositis	1. epizoda FN
2	M	17	ALL-HR	12	HK	D8 +++ D10 +	D8 <i>C. glabrata</i>	G+ sepse D1	2. epizoda FN
3	M	5	neuroblastom	10	HK [#]	D8 +++	D8 <i>C. tropicalis</i>	FN, septický CVK D8	extrakce CVK D10
4	M	4	ALL	6	HK	D1 ++	negativní	FN, mukositis	<i>C. albicans</i> ve výtěru z krku D1
5	Ž	3	ALL	9	HK	D8 +	negativní	G- sepse D1, mukositis	<i>C. albicans</i> ve výtěru z krku D1
6	M	4	ALL	2	HK [#]	D1 +++	negativní	septický CVK D1	extrakce CVK D2
7	M	9	ALL	3	HK [#]	D1 +++	D1 <i>C. tropicalis</i>	septický CVK D1	extrakce CVK D2
8	Ž	12	ALL	8	HK	D5 ++ D8 +++ D11 ++	D8 <i>C. albicans</i>	FN, diseminovaná plicní kandidóza D5-14	
9	M	1	AML	5	HK	D1+ D8 +	opakovaně negativní	FN, mukositis	
10	Ž	4	AML	8	HK	D8 ++ D15 +	opakovaně negativní	G+ sepse D3	

⁺ ALL = akutní lymfoblastická leukemie (HR = vysokého rizika), AML = akutní myeloidní leukemie

⁺⁺ vyšetření na přítomnost houbové DNA z abscesové dutiny biopsie plic

[§] D = den od začátku febrilní neutropenie

^{§§} G-, G+ sepse = sepse Gram negativními, resp. Gram pozitivními, bakteriemi prokázaná kultivačním nálezem z hemokultury

^{*} FN = febrilní neutropenie; CVK = centrální venózní katetr;

^{**} Biologický materiál (HK = hemokultura odebraná z periferní žíly; HK[#] = hemokultura odebraná z CVK při PCR negativním nálezem hemokultury z periferní žíly), který byl vyšetřován metodou PCR na přítomnost houbové DNA a současně také kultivačně.

^{***} Semikvantitativní vyšetření metodou polymerázové řetězové reakce na přítomnost houbové DNA v biologickém materiálu: +++ silně pozitivní, ++ středně pozitivní, + slabě pozitivní, - negativní

Antimykotická léčba fluconazolem v dávce 10-12mg/kg/den i.v. byla zahajována na základě pozitivního nálezu houbové DNA v krvi do 24 hodin po odběru nebo na základě kultivačního nálezu *C. albicans* v krvi. Fluconazol byl podáván minimálně 7 dní od posledního pozitivního nálezu houbové DNA v krvi metodou PCR, nejméně však 14 dní. V případě kultivačního nálezu flukonazol-rezistentní *C. glabrata* a *C. tropicalis* byli pacienti léčeni amfotericinem B v obvyklé dávce po dobu minimálně 14 dní. Pacient č.1 v tab.1 dostával v období FN fluconazol na základě pozitivního nálezu houbové DNA v krvi. Kultivační vyšetření na přítomnost hub byla v tomto období nevytěžná. Po zjištění aspergilomy, který se objevil za 8 týdnů od začátku FN, byl pacient, vzhledem ke sníženým renálním funkcím po předchozí chemoterapii obsahující cis-platinu, přeléčen liposomálním amfotericinem 4mg/kg/den i.v. po dobu 28 dní a dále itraconazolem p.o. po dobu 2 měsíců.

Diskuze

Zástupci rodů *Candida* a *Aspergillus* se v posledních letech dostali mezi 10 nejčastějších patogenů nacházených v období FN u onkologických pacientů (2). Právě proto je věnována velká pozornost jejich diagnostice a léčbě. Naše výsledky ukazují, že citlivost detekce mykotických infekcí metodou PCR byla vyšší než detekce kultivací, což je dáno relativně nižší citlivostí kultivačních metod. Obzvláště u intenzivně léčených pacientů bývá vysoká sérová hladina antimykotik, což může být rovněž zdrojem neúspěchu kultivace na umělých půdách. Vysoká citlivost PCR metody byla ještě zesílena detekcí úseku DNA, který se nachází v genomu hub

ve 40 až 80 kopiích, což umožňuje zachyt až jednotlivých mikroorganismů ve vzorku klinického materiálu. Samotné vyšetření je možno provést během 4 hodin po obdržení biologického materiálu, což žádná jiná metoda přímé detekce patogenního mikroorganismu neumožňuje. Velmi přínosný je také fakt, že metoda umožňuje vyšetřování prakticky jakéhokoliv biologického materiálu.

V předkládané práci byla detekována vysoce konzervativní univerzální sekvence, vyskytující se v genomu všech klinicky významných patogenních hub, nikoliv však v genomu bakterií, *Pneumocystis carinii*, živočichů a většiny rostlinných druhů. Z obr.1 je zřejmý určitý rozdíl ve velikostech amplifikačních produktů, který je způsoben mezidruhovým délkovým polymorfismem v této sekvenci. Samotná sekvence ITS2 je totiž vysoce druhově sekvencně specifická, což do budoucna zřejmě umožní nejen velmi rychlou univerzální detekci, ale také rychlou druhovou specifikaci detekovaných patogenních hub.

Klinický přínos rychlé DNA diagnostiky patogenních hub je nesporný. Často diskutovanou otázkou však zůstává nasazení vhodné antimykotické terapie (1-4). Amfotericin B představuje vysoce účinný lék jak v profylaxi, tak v terapii mykotické infekce u imunosuprimovaných pacientů s širokým spektrem účinku na většinu patogenních hub, včetně nejčastěji se vyskytujících kmenů rodů *Candida* a *Aspergillus*.

Obávanou komplikací léčby amfotericinem B je nefrotoxicita, která může limitovat jeho použití, zejména u pacientů léčených nefrotoxickými cytostatiky, antibiotiky či jinými nefrotoxickými léky. Slibnou se ukazuje možnost tuto nefrotoxicitu výrazně

omezit vhodnou profylaxí (21, 22), případně použitím liposomálního amfotericinu B, který je podstatně méně nefrotoxický, avšak ekonomicky značně nákladný (1,2,6). Novou skupinou antimykotik jsou azolové deriváty. Především fluconazol je minimálně toxický a vysoce účinný u většiny infekcí způsobených *Candida sp.*, zejména *C. albicans*, jak bylo opakovaně prokázáno experimentálně i v klinických studiích (2,3,17). Vzhledem ke zjištění, že kandidové infekce tvoří asi 2/3 všech mykotických infekcí u onkologických pacientů, jeví se jeho použití v první linii antimykotik jako oprávněné. Léčba antimykotiky je zpravidla zahajována empiricky po 3- až 5denním trvání FN, která nereaguje na léčbu antibiotiky (1,4,6). V našem souboru jsme měli možnost, vzhledem k rychlé detekci PCR metodou při diagnostice patogenních hub, zahájit cílenou antimykotickou léčbu na základě pozitivního nálezu houbové DNA do 24 hodin. Neprodlené zahájení léčby flukonazolem a extrakce houbami infikovaného CVK znamenala rychlé zlepšení klinického stavu pacientů.

Pacienti s kultivačním nálezem flukonazol-rezistentní kvasinky, resp. aspergilla, byli úspěšně léčeni amfotericinem B. Použití tohoto toxického antimykotika tak bylo vyhrazeno pouze pro léčbu čtyř z 11 epizod mykotické infekce, ostatní epizody byly úspěšně zvládnuty časnou léčbou flukonazolem. Závěrem je nutné zdůraznit, že genetické metody nemohou v klinické praxi zcela nahradit klasické mikrobiologické metody. Neumožňují například prozatím analýzu rezistencí zachycených kmenů k antimykotikům. Z praktického hlediska jejich masivní nasazení limituje také jejich stále relativně vyšší cena. Přes všechny jejich nesporné výhody je i nadále vhodné je používat společně s metodami kultivačními. Pro jejich vysokou rychlost a citlivost je pak vhodné doplňovat klasickou diagnostiku infekčních komplikací u těch skupin pacientů, které jsou z hlediska mykotických infekcí obzvláště rizikové.

Literatura

- Pizzo P.A., Poplack D.G.: Principles and practice of pediatric oncology. Lippincott-Raven 1997: 103-28;
- Kibbler C.C., Prentice H.G.: A reappraisal of current approaches to the management of fungal infections in neutropenic patients. Curr. Opin. Infect. Dis. 1998, 11: 397-400;
- De Pauw B.E.: Practical modalities for prevention of fungal infections in cancer patients. Europ. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. 1997, 16: 32-41;
- Pizzo P.A.: Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. N. Engl. J. Med. 1993, 328: 1323-31;
- Lehmanbecher T., Foster C., Vázquez N., et al.: Therapy-induced alterations in host defense in children receiving therapy for cancer. J. Ped. Hematol. Oncol. 1997, 19: 399-417;
- Bodey G.P., Bueltmann B. et al.: Fungal infections in cancer patients. Europ. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. 1992, 11: 99-109;
- Martino P., Girmenia C., et al.: *Candida* colonization and systemic infection in neutropenic patients. Cancer. 1989, 64: 2030-4;
- Anaissie E., Bodey G.P., et al.: New spectrum of fungal infections in patients with cancer. Rev. Infect. Dis. 1989, 11: 369;
- Pizzo P.A., Robichaud K.J., et al.: Fever in the pediatric and young adult patient with cancer: prospective study of 1001 episodes. Medicine 1982, 61: 153;
- Dupont B.: Clinical manifestations and management of candidosis in the compromised patient. In D.W. Warnock and M.D. Richardson (ed.): Fungal infection in the compromised patient 1990, 55-84;
- Kaufman L.: Mycoserology: its vital role in diagnosing systemic mycotic infections. Jpn. J. Med. Mycol. 1983, 24: 1-8;
- Kaufman L., Reiss E.: Serodiagnosis of fungal diseases. In N.R. Rose, H. Friedman, J.L. Fahey (ed.), Manual of clinical laboratory immunology 1986, 446-66;
- Bougnoix M.E., Hill C., et al.: Comparison of antibody, antigen and metabolite assays for hospitalized patients with disseminated or peripheral candidiasis. J. Clin. Microbiol. 1990, 28: 905-9;
- Dendis M., Horváth R., Černý J., Benedík J.: Využití genetických metod při detekci patogenů u komplikací po rozsáhlých chirurgických výkonech. Rozhl. Chir. 1998, 77: 567-73;
- Shin J.H., Nolte F.S., Morrison C.J.: Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. J. Clin. Microbiol. 1997, 35: 1454-9;
- Kappe R., Okeke C.N., et al.: Molecular probes for the detection of pathogenic fungi in the presence of human tissue. J. Med. Microbiol. 1998, 47: 811-20;
- Walsh T.J., Lee J., et al.: Experimental basis for use of fluconazole for preventive or early treatment of disseminated candidiasis in granulocytopenic host. Rev. Infect. Dis. 1990, 12 (Suppl. 3): S307-17
- Holmes A.R., Cannon R.D., Shepherd M.G., Jenkinson H.F. Detection of *Candida albicans* and Other Yeasts in Blood by PCR. J Clin Microbiol. 1994, 31(1): 228-231
- Fujita S., Lasker B.A., Lott T.J., Reiss E., Morrison C.J. Microtitration Plate Enzyme Immunoassay To Detect PCR-Amplified DNA from *Candida* Species in Blood. J Clin Microbiol. 1995, 33(4): 962-967
- Mayer J., Kovářik A., Vorlíček J., Čihálová J., Kubálek V. Efficacy of polymerase chain reaction for detection of deep mycotic infections: Confirmation by autopsy. Mycoses 1998, 41: 471-475
- Mayer J., Doubek M., Vorlíček J. Must we really fear toxicity of conventional amphotericin B in oncological patients? Support. Care Cancer 1999, 7: 51-56
- Mayer J., Doubek M. Nefrotoxická konvenčního amfotericinu B u onkologických nemocných a možnosti její profylaxe. Klin.Onkol. 1998, 11: 101-106

informace

Nadační fond dr. Paula Janssena

vypisuje Hynkovu cenu

za nejlepší práci publikovanou v roce 2000 v oboru hematologie

Do výběru budou zařazeny všechny práce, které budou doručeny do sídla Nadačního fondu dr. Paula Janssena do **30. 4. 2001** a budou splňovat tato kritéria:

původní vědecká práce, monografie nebo učebnice, publikovaná v celém rozsahu v České republice či v zahraničí v roce 2000

hlavní autor je občanem ČR

hlavní autor zašle do sídla nadace 5 kopií přihlašovaného článku, případně 1 originál knihy (který po vyhodnocení nevracíme) spolu s písemným souhlasem spoluautorů práce

Zároveň je poprvé vyhlášena kategorie **Popularizace vědy**, do které mohou být přihlášeny populárně naučné knihy (případně články širšího dopadu) ve vybraných oborech včetně hematologie. Ostatní

podmínky (občanství ČR, počet kopií, souhlas spoluautorů) jsou shodné s Hynkovou cenou.

Přihlášené práce budou posouzeny odbornou komisí (v případě kategorie Popularizace vědy správní radou Nadačního fondu), v níž zasedají přední zástupci v oboru v ČR. Při hodnocení bude přihlédnuto především k aktuálnosti zpracovávané problematiky, přínosu pro další rozvoj oboru, originalitě myšlenek i formě zpracování.

Každá cena je spojena s nadačním příspěvkem ve výši 50 000 Kč, určeným k podpoře další vědeckovýzkumné činnosti.

Zájemce o účast prosíme, aby své práce zasílali do 30. 4. 2001 na adresu:

Janssen-Cilag

Nadační fond dr. Paula Janssena

k rukám pí Jitky Aubrechtové

Na Radosti 399

155 25 Praha 5-Zličín