

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Molekulárně genetická diagnostika mykobakterií

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Barbora Voxová

Školitel-specialista: Mgr. Naděžda Sojková

Hradec Králové, 2010

Václava Zítková

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

15.11.2010

Václava Zítková

Poděkování

Toto poděkování patří především paní Mgr.Naděždě Sojkové, mé vedoucí ve virologických laboratořích ve Zdravotním ústavu se sídlem v Praze, za odbornou pomoc a všechny čas, který mi věnovala při přípravě bakalářské práce. Dále děkuji mému školiteli PharmDr. Barboře Voxové za vstřícnost a užitečné rady.

Obsah:

Teoretická část:

1	MYKOBAKTERIA	5
1.1	Společné vlastnosti mykobakterií:	5
1.2	Morfologie:	5
1.3	Fyziologie a kultivace:	5
1.4	Patogenita a rozdělení:	6
2	VÝZNAM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS:	7
2.1	Epidemiologie:	7
2.2	Patogeneze:	7
2.3	Terapie:	8
3	ODBĚR VZORKŮ:	10
3.1	Základní zásady	10
3.2	Provedení odběru jednotlivých druhů vzorků:	10
3.2.1	Sputum:	10
3.2.2	Indukované sputum:	10
3.2.3	Bronchoalveolární laváž:	11
3.2.4	Laryngeální výtěr:	11
3.2.5	Výtěry a stěry z píštělí, hnisavých procesů a ran:.....	11
3.2.6	Moč:	12
3.2.7	Likvor, Pleurální výpotek, punktát:	12
3.2.8	Bioptický a sekční materiál:	12
3.2.9	Krev na vyšetření antimykobakteriálních protilátek:.....	12
4	ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ:	13
5	BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PRO MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII:	15

Reagencie:

6	IZOLACE DNA NA AUTOMATICKÉM IZOLÁTORU :	16
6.1	Automatická izolace na přístroji Chemagen – Prepito:	16
6.2	Princip izolační metody:	17

6.3	Postup:	17
6.3.1	Reagencie a pomůcky potřebné k izolaci:	17
6.3.2	Další potřebné vybavení:	17
6.3.3	Příprava roztoků:.....	18
6.3.4	Zpracování vzorků :	18
6.3.5	Příprava stojánku (tip& tube rack):	18
7	DETEKCE:	20
7.1	Detekční kit: MTB RT (EliGene):	21
7.1.1	Pracovní postup pro detekci DNA z izolovaného vzorku.....	21
7.1.1.1	Vybavení laboratoře:	21
7.1.1.2	Obsah soupravy:	21
7.1.1.3	Nastavení přístroje:.....	21
7.1.1.4	Skladování kitu:.....	22
7.1.2	Pracovní postup:	22
8	PRINCIP POUŽITÉ METODY:	23
	<u>Praktická část:</u>	
9	ODEČÍTÁNÍ VÝSLEDKŮ:	26
9.1	Pozitivní výsledek:	26
9.2	Negativní výsledek:	27
9.3	Inhibice reakce:	28
9.4	Kontrola kvality:	29
9.4.1	Vnitřní kontrola:	29
9.4.2	Pozitivní kontrola:.....	29
9.4.3	Negativní kontrola:	29
9.4.4	Řešení problémů:	29
9.4.5	Upozornění:	29
10	VÝSLEDKY :	30
10.1	Shrnutí výsledků vzorků	32
11	DISKUZE:	33
12	ZÁVĚR:	35
13	SEZNAM LITERATURY:	36
13.1	Použité zkratky:	37

Teoretická část:

1 Mykobakteria

1.1 Společné vlastnosti mykobakterií:

Do rodu *Mycobacterium* patří bakterie neobvyklých vlastností morfologických, kultivačních, patogenních a terapeutických. Název rodu odráží zdánlivou podobnost těchto bakterií s plísněmi ve smyslu pomalého růstu a vzhledu kolonií. Mykobakteria ale ve skutečnosti s plísněmi nemají nic společného. Podle vysokého obsahu G+C ve své DNA jsou příbuzná bakteriálním rodům *Corynebacterium* a *Nocardia*.

1.2 Morfologie:

Mykobakteria jsou nepohyblivé, nesporulující, většinou štíhlé tyčinky, které nelze obarvit dle Grama pokud se užije běžného postupu. Je to dáno vysokým obsahem lipidů ve stěně mykobakterií, zejména vosků obsahujících dlouhé větvené řetězce mykolových kyselin. K obarvení například fuchsinem nebo fluorescenčním barvivem auraminem je musíme přinutit přidavkem mořidla (fenolu), případně barvením za horka. Obarvená mykobakteria zase nelze odbarvit a to ani za pomoci směsi alkoholu s HCL, proto se označují jako acidorezistentní.

Stavba buněčné stěny mykobakterií je poměrně složitá, ale v podstatě odpovídá grampozitivním mikrobům. Na vrstvu peptidoglykanu jsou však postupně navázány polysacharid arabinoglykan a mykolové kyseliny o 60 až 90 atomech uhlíku. Hydrofobní zevní vrstva obsahuje jednak rozmanité lipidy, jednak polypeptidy stimulující buněčnou imunitu. Extrakt těchto polypeptidů zvaný PPD (z angl. purified protein derivatives) nahradil původní Kochův tuberkulin a slouží ke zjišťování pozdní přecitlivělosti na mykobakteriální antigeny [1].

1.3 Fyziologie a kultivace:

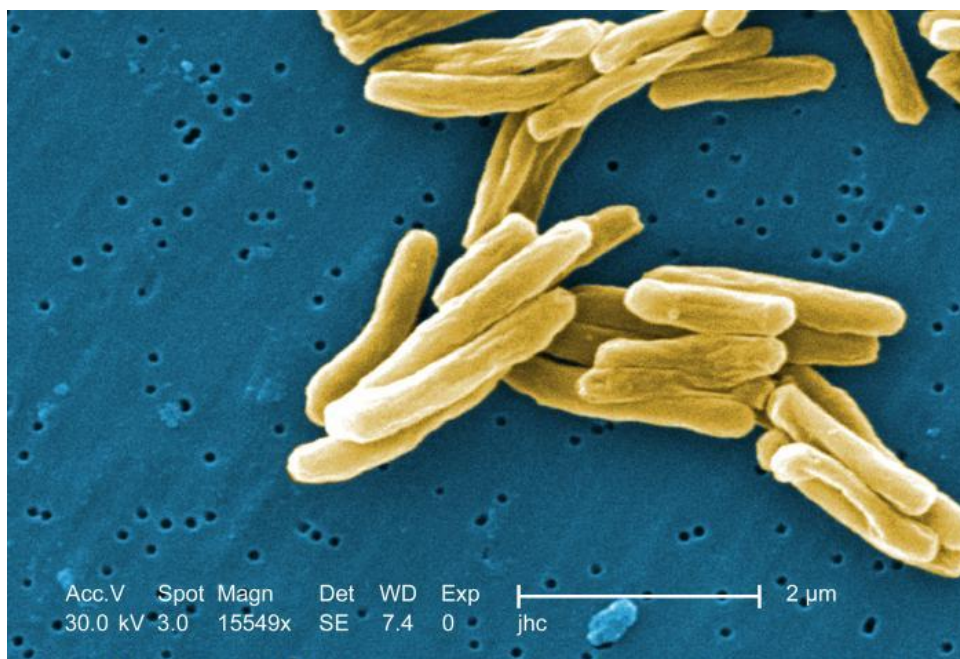
Mykobakteria jsou aerobní a mnohá se vyznačují velmi dlouhou generační dobou, většina z nich roste pomalu. Kolonie se objeví až za několik týdnů, často jsou žlutavě pigmentovány a některé se vyznačují drsným povrchem. I když většina roste na velmi jednoduchých půdách s asparaginem, glycerolem, minerálními solemi a vejci nebo hovězím sérem (půdy tekuté), některá vyžadují další přísady jako např. kyselinu pyrohroznovou. Některá mykobakteria je třeba pěstovat při

nižší teplotě než je 37°C, jiná dávají přednost teplotám až 45°C. *Mycobacterium leprae* se zatím mimo živé buňky pěstovat nepodařilo. Mykobakteria jsou poměrně odolná na zevní vlivy, zejména na vysychání a na chemické látky.

1.4 Patogenita a rozdělení:

Většina mykobakterií žije jako pouhé saprofyty v půdě a vodě, část z nich se může uplatnit jako oportunní patogeny zvířat a člověka a pro některá, jako je komplex *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium leprae*, jsou hlavní ekologickou nikou tkáně člověka a jiných teplokrevných obratlovců.

Dělení dle Runyona zůstává stále nejužitečnější. Po vyčlenění komplexu *M. tuberculosis* se zbytek dělí dle pigmentace kolonií a rychlosti růstu na fotochromogeny- pigmentují jen na světle (*M. kansasii*), skotochromogeny- rostou v barevných koloniích i potmě (*M. gordonae*), nonchromogeny- netvoří výrazně barevné kolonie (komplex *M. avium*) a rychle rostoucí mykobakteria, která vyrostou během několika dní (komplex *M. fortuitum-chelonae*) [2].



Obr.1 Mykobakteria v elektronovém mikroskopu
(<http://www.stefajir.cz/?q=tuberkuloza>)

2 Význam Mycobacterium tuberculosis:

Patří k nejvýznamnějším patogenům člověka. Nakažena je jím až jedna třetina lidské populace asi u 10% lidí se během života projeví příznaky tuberkulózy a až 3 miliony osob na ni ročně zemře.

2.1 Epidemiologie:

Výskyt onemocnění v západních zemích, ke kterým je řazena i Česká republika, se pohybuje v rozmezí 13 - 15 nových případů na 100 000 obyvatel. Rizikové skupiny jsou především toxikomani, bezdomovci, vězni, obyvatelé hromadných zařízení, lidé s oslabenou imunitou (zejména HIV pozitivní) a chabou fyzickou kondicí.

Nejčastější formou tuberkulózy je její plicní forma, která představuje 85 % všech onemocnění. Urogenitální postižení je druhou nejčastější formou mimoplicního postižení a tvoří asi 20 % těchto forem.

V České republice má výskyt nových onemocnění od roku 1970 trvale klesající tendenci, ale zvyšuje se procento importovaných případů - cizinců. Podobná je epidemiologická situace i v USA, které jsou imigrací obyvatelstva a epidemií AIDS zasaženy výrazněji než evropské země [3].

Na základě těchto informací je možné předpokládat, že Evropě v nejbližších letech prudký nárůst tuberkulózy zřejmě nehrozí její výskyt bude stagnovat nebo se snižovat a bude spíše importovanou chorobou. To ovšem závažnost a nebezpečnost tuberkulózní infekce nesnižuje.

2.2 Patogeneze:

Záleží na velikosti infekční dávky a na úrovni odolnosti jedince zda se infekce projeví jako onemocnění. Během prvních dvou let po infekci zjevně onemocní asi 5% nakažených, dalších 5% později během života i desítky let po infekci.

Vstup mykobakterií do organismu se nejčastěji uskutečňuje aerogenní cestou, u naprosté většiny případů primární tuberkulózy jsou postiženy plíce. Vzácnější je přímá infekce (iatrogenně, kontaminované předměty, pohlavní styk). Pohlcení mykobakterií makrofágy, jejich lýza a transport do regionálních mízních uzlin vytváří tzv. „primární komplex“. Ten se může vyhojit ad integrum nebo přejít do

„klidového stádia“ ve kterém mohou mykobakteria přežít v inaktivní formě řadu let.

Základní jednotkou tuberkulózní infekce je specifický granulom. Vzniká v místě primárního komplexu nebo v místech diseminace. Mykobakteria jsou schopna přežít uvnitř granulomu. Výsledkem pozdního rozsevu je vznik tzv. post-primární tuberkulózy řadu let až desetiletí po primární infekci [4].

Mykobakterium je vysoce odolné vůči vyschnutí, v prachu vydrží až 10 dnů, ve vyschlém sputu až 8 měsíců. Z desinfekčních prostředků spolehlivě zabírají především deriváty fenolu a aldehydy (lyzol 1%, Persteril 0.5%, Chloramin B 5%...), detergenty jsou neúčinné. K dekontaminaci povrchů je nejvhodnější UV záření k němuž jsou mykobakteria velmi citlivá. Pokud to jde dáváme před desinfectí přednost autoklávování [6].

Morfologie:

Tuberkulózní mykobakterie jsou acidorezistentní tyčky, nepohyblivé, nesporulují a nemají pouzdro. Jsou rovné nebo slabě zahnuté o rozměrech přibližně 3.0 x 0.3 mikrometry. Ve sputu a v klinických materiálech se vyskytují jako izolované buňky nebo v drobných shlucích.

2.3 Terapie:

S nástupem antituberkulotik téměř vymizela chirurgická léčba aktivní tuberkulózy, jako byly opakované pneumothoraxy stejně jako klidová a klimatická léčba v sanatoriích. Léčba tuberkulózy nyní spočívá v kontrolovaném podávání kombinací několika antituberkulotik. Příslušné léčebné režimy jsou pro různé kategorie nemocných standardizovány. Cílem iniciální fáze, která trvá obvykle dva měsíce, je co nejvíce snížit počet mykobakterií, v pokračovací fázi se snažíme ložisko postupně sterilizovat. Pokračovací fáze trvá 6 – 8 měsíců a aby byla mykobakteria zasažena během období intenzivního metabolismu a dělení antituberkulotika se v ní podávají intermitentně.

Základními tuberkulotiky jsou isoniazid (hydrazid kys. isonikotinové, INH), rifampicin (RMP), pyrazinamid (PZA), ethambutol (EMB), případně streptomycin (STM). Nové bakteriologicky ověřené onemocnění tuberkulózou léčíme zpočátku čtyřkombinací a poté pokračujeme dvojkombinací. Kombinovaná léčba je nutná, aby se zabránilo vzniku rezistentních mutant, které vznikají s frekvencí jednou za

10e8 buněčných dělení. Jako multirezistentní se označují kmeny necitlivé na isoniasid a rifampicin. Dnes se tyto kmeny přicházející hlavně z východu stávají vysoce nebezpečnými pro neúčinnost léčby [5].

3 Odběr vzorků:

3.1 Základní zásady

Základním předpokladem kvalitního výsledku vyšetření je správně provedený odběr infekčního materiálu. K odběru je nutné použít doporučené sterilní nádoby, jejichž transport do laboratoře je nutno zajistit tak, aby při něm nedošlo ke znehodnocení materiálu a ohrožení okolí. Pro delší transport jsou vhodné transportní chladicí boxy. Dále musí být zajištěna řádná dokumentace vzorku a jeho včasné dodání do laboratoře.

Odebraný vzorek musí být adekvátní lokalizaci onemocnění a jeho formě.

Pověřený zdravotnický pracovník musí po odběru zkontrolovat, že nádoba je řádně označena jménem pacienta, je dobře uzavřena a obsahuje dostatečné množství vzorku.

Pro odběr vzorků na vyšetření molekulárně biologickými metodami platí stejné zásady jako u klasických metod. Protože vzorek je paralelně vyšetřován i klasickými metodami musí mít odpovídající kvalitu i kvantitu.

3.2 Provedení odběru jednotlivých druhů vzorků:

3.2.1 Sputum:

Odebírá se ráno nalačno před hygienou ústní dutiny. Pacienta je nutno upozornit, že pro získání kvalitního vzorku musí několikrát důkladně zakašlat se zavřenými ústy tak, aby byl získán kvalitní vzorek z dolních cest dýchacích. U pacienta, který nevykašlává je možno dosáhnout expektorace po podání expektorancií den před odběrem nebo po inhalaci.

U nových pacientů se odebírají vzorky po třech po sobě následujících dnech, u léčených pacientů je kontrola provedena podle klinického stavu (nejméně však 1x za měsíc).

3.2.2 Indukované sputum:

Získává se od pacienta, který spontánně nevykašlává, po inhalaci solného roztoku. Inhalátor musí být opatřen nebulizační tryskou, která uvolňuje kapičky roztoku o velikosti 0,5 – 5 μm . Do debulizační nádoby se dá 15% roztok NaCl ve sterilní

destilované vodě. Proud vzduchu poháněného kompresorem má při výstupu dosahovat 21 -28 kPa. Pacient je vyzván k 15 vdechům aerosolového solného roztoku ze vzdálenosti 3 – 4 cm od výstupu. Vlastní inhalace trvá 2 – 3 minuty. Po 15 – 30 minutách po inhalaci je pacient vyzván k vykašlání sputa. Vzorek je označen jako indukované sputum, aby nebyl považován za sliny.

3.2.3 Bronchoalveolární laváž:

Odběr se nejčastěji provádí na bronchologickém sálku při lokální anestézii. V případě těžkého stavu pacienta je možné provedení na lůžku. Odběr se provádí flexibilním bronchoskopem v dolních cestách dýchacích. Výplachovou tekutinou je 100 – 300 ml fyziologického roztoku ohřátého na 37 °C. Bronchoalveolární laváž je metodou používanou při diagnostice plicních zánětlivých komplikací zejména u imunokompromitovaných osob.

3.2.4 Laryngeální výtěr:

Je pro nízkou citlivost pro průkaz mykobakterií (méně než 50% při srovnání se sputem) a pro vysoké riziko infekce při odběru používán výjimečně. Například u nespolupracujících pacientů - malé děti, staří lidé.

Odebírá se ráno nalačno před provedením hygieny ústní dutiny. Jeden vzorek představují tři laryngeální sondy z chrommolybdenového drátku odebrané při jednom odběru. Před odběrem jsou ponořeny do sterilní destilované vody.

Tampón je pak zasunut nad epiglotis a pacient je vyzván, aby prudce zakašlal. Po odběru je tampón zasunut zpět do zkumavky. Pro odběr jsou zcela nevhodující odběrové soupravy s jiným než chrommolybdenovým drátkem nebo s umělohmotnou špejlí a transportním médiem.

3.2.5 Výtěry a stěry z píštělí, hnisavých procesů a ran:

Odebírají se na 3 laryngeální sondy zvlhčené v destilované vodě. Pokud je možno získat z postiženého ložiska tekutý materiál odebírá se do injekční stříkačky, kterou lze použít i k transportu do laboratoře.

3.2.6 Moč:

Odebírá se ráno - střední proud moči. K odběru se použije sterilní nádobka umělohmotná nebo skleněná se širokým hrdlem, do které lze přímo odebrat 50 – 100 ml vzorku. Odběr se opakuje 3 dny po sobě.

3.2.7 Likvor, Pleurální výpotek, punktát:

Odebírají se za aseptických podmínek v množství 3 – 5 ml. Při větším množství se vzorek koncentruje centrifugací 20 min. při 2000g.

3.2.8 Bioptický a sekční materiál:

Část tkáně (cca 2 cm³) se odebere do sterilní nádobky. Ke vzorku nesmí být přidán žádný fixační ani konzervační prostředek. Vzorky tkání se homogenizují v třecí misce se sterilním mořským pískem nebo s rozdrcenými krycími sklíčky nebo pomocí tkáňového homogenizátoru. U tuhých tkání se doporučuje před homogenizací přidat cca 0,5 – 1 ml sterilní destilované vody nebo fyziologického roztoku.

3.2.9 Krev na vyšetření antimykobakteriálních protilátek:

Odebírá se do sterilních krevních skleněných zkumavek nebo do zkumavek pro biochemická vyšetření v množství 5 – 7 ml. Pro vyšetření se používá srážlivá krev, která nesmí být hemolyzovaná nebo chylózní.. Pro delší transport je vhodnější zasílat krevní sérum (2 – 3 ml) [6].

4 Zpracování vzorků:

Sputum:

Reagencie:

Roztok laurylu: lauryl sulfát sodný(dodecyl sulfát sodný-LSS) rozpustíme v destilované vodě za tepla a přidáme NaOH. Roztok laurylu uchováváme při 37°C.

Roztok kyselé vody: roztok HCl, připravuje se vždy čerstvý.

Do každé zkumavky s odebraným sputem přidáme 3 ml roztoku laurylu a necháme 20 minut protřepávat. Zkumavku doplníme po rysku 35 ml kyselou vodou a centrifugujeme 20 minut při 2500 ot./min. Supernatant slijeme a necháme asi 5 ml se sedimentem, promícháme. Část vzorku (asi 1 ml) oddělíme pro molekulární biologii, zbytek použijeme na očkování půd.

Oddělený vzorek pro molekulární biologii centrifugujeme v chlazené centrifuze 10 min. při 15000 ot./min. a 8°C. Dále pracujeme se sedimentem.

Bal, výtěr:

U silně zahleněných vzorků nejprve použijeme postup pro rozpuštění –zkapalnění hlenů:

Reagencie:

2,94 % roztok citronanu sodného

4% Na OH

NALC (N-acetyl-L-cystein)

Roztok vždy připravujeme těsně před použitím čerstvý!

Do 3 ml citronanu napipetujeme 3 ml NaOH (4%), po promíchání přidáme ke 30 mg NALC.

Důkladně promícháme a v poměru 1:1 smícháme se zahleněným vzorkem.

Necháme působit tak dlouho, dokud hlen nezkapalní. Centrifugujeme v chlazené mikrocentrifuze 10 min. při 13 000 ot./min. Odsajeme opatrně supernatant a ve zkumavce ponecháme sediment. Připipetujeme PBS(-odhadem, doplníme zkumavku) a promícháme. Centrifugujeme v chlazené mikrocentrifuze 10 min. při 13 000 ot./min. Opatrně odsajeme supernatant a dále pracujeme se sedimentem[6].

Pevná tkáň:Reagencie:

fyziologický roztok

Pevnou tkáň skalpelem nařezáme na tenké proužky. Jedná-li se o tracheu, pak 2 sterilními pinzetami stáhneme povrchový epitel a ten dále zpracujeme následujícím způsobem: proužek tkáně nebo epitel vložíme do třecí misky s mořským pískem a přelijeme fyziologickým roztokem, rozdrťíme. Předdrcenou tkáň dále homogenizujeme v homogenizátoru. Centrigujeme 10 min. při 2000 ot./min. Supernatant použijeme pro izolaci nukleových kyselin.

Ostatní materiály v tekutém stavu:

Vzorek pro PCR centrifugujeme v chlazené centrifuze 10 min. při 15000 ot./min. a 8°C a dále pracujeme se sedimentem.

5 Bezpečnostní opatření pro molekulární biologii:

Molekulárně – biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.

Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Musí být zabezpečeno, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin, nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.

Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice, pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo detekci. Nikdy se nesmí přenášet laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od začátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracován v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny současně. Automatické pipety užívané pro práci s biologickým materiálem musí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musí být používány špičky s filtrem, sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz/RNáz.

S reagensy musí být pracováno v PCR boxu (biohazard box, nikoliv laminární box) a s automatickými pipetami používanými specificky pro práci s reagensy. S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.

Doporučujeme používat odlišnou mikropipetu pro pipetování mastermixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivní kontroly [7].

Reagencie:

6 Izolace DNA na automatickém izolátoru :

6.1 Automatická izolace na přístroji Chemagen – Prepito:

Izolace na přístroji chemagen Prepito je založena na principu izolace nukleových kyselin pomocí magnetických částic. Přístroj umožňuje také použití barkódu. Automatické dávkování pufrů a ruční práce je zde minimalizována. Proces izolace trvá přibližně 45 minut a to ať izolujeme pouze 1 nebo 12 vzorků současně.

Magnetické separace je dosaženo za pomoci kovových hrotů, které jsou zmagnetizovány vnějším magnetem a které jsou několikrát zanořovány do promývacích roztoků. V jednotlivých krocích, kde dochází k rozsuspendování pelety tvořené magnetickými částicemi (např. v promývacím nebo elučním roztoku), je magnet vypnut. Účinné rozsuspendování pelety je poté provedeno rychlou rotací kovových hrotů, které zaručí dokonalé a jemné rozsuspendování pelety. Tento krok pracovního postupu umožní rychlé a důkladné promíchání. Výsledkem izolace je produkt o vysokém výtěžku a čistotě [8].



Obr. 2 Izolátor Prepito
(<http://www.elisabeth.cz/chemagen>)



Obr. 3 Hřebens magnetickými hroty

6.2 Princip izolační metody:

Do vzorku s lyzačním roztokem je přidána suspenze mikroparticulí s kovovým jádrem a vazebným pufrům. Následuje inkubace při teplotě 56°C a poté fixační a promývací proces, při němž elektromagnet fixuje mikroparticule na kovový hrot, zatímco veškerý balast je odmyván a odsáván ze zkumavky.

Po přidání elučního pufru dojde k uvolnění NK z mikroparticule.

6.3 Postup:

6.3.1 Reagencie a pomůcky potřebné k izolaci:

Magnetic Beads-roztok s magnetickými částicemi

Lysis Buffer- lyzační pufr

Elution Buffer-Eluční pufr

Binding Buffer-Vazebný pufr

Wash Buffer-Promývací pufr (č.3 a 4)

Protease-proteáza

Poly (A) RNA

Poly (A) RNA Buffer

96-jamková destička –Deep Well Plate (DWP)

Stojánek (Tip and Tube Rack)

Izolační mikrozkušavky

Plastové špičky

6.3.2 Další potřebné vybavení:

Laminární box

Stojánek se sadou kalibrovaných automatických pipet 0,5-5 μ l, 30-300 μ l a 100-1000 μ l

Jednorázové sterilní špičky s filtrem 5 -1000 μ l (proště DNA/RNA a Dnáz/Rnáz-CE)

Zkušavky eppendorf 1,5 ml

Sterilní stojánek pro mikrozkušavky

Vortex, mikrocentrifuga, thermomixer

Kontejner na odpad

Obličejové roušky na jedno použití

Latexové nebo vinylové rukavice bez pudru

6.3.3 Příprava roztoků:

Poly(A) RNA : rozpustit lyofilizovanou Poly(A) RNA 440 ul pufru Poly(A) RNA Buffer a promíchat.

Proteáza: rozpustit lyofilizovanou proteázu 1 ml H₂O pro PCR a promíchat.

Rozředěná proteáza je stabilní po dobu 2 měsíců při 2 - 8°C, nebo -20°C.

Roztok s magnetickými částicemi: před použitím homogenizovat promícháním.

6.3.4 Zpracování vzorků :

Do mikrozkušavky napipetujeme : 200 ul vzorku

200 ul lyzačního pufru

10 ul proteázy

4 ul poly(A) RNA

20 ul intrení kontroly

Mikrozkušavku se směsí uzavřeme, zvortexujeme a zcentrifugujeme.

Inkubujeme 10 min. při 56 °C s občasným promícháním.

Po inkubaci směs z mikrozkušavky přepipetujeme do desky (DWP) na pozici A.

6.3.5 Příprava stojánku (tip& tube rack):

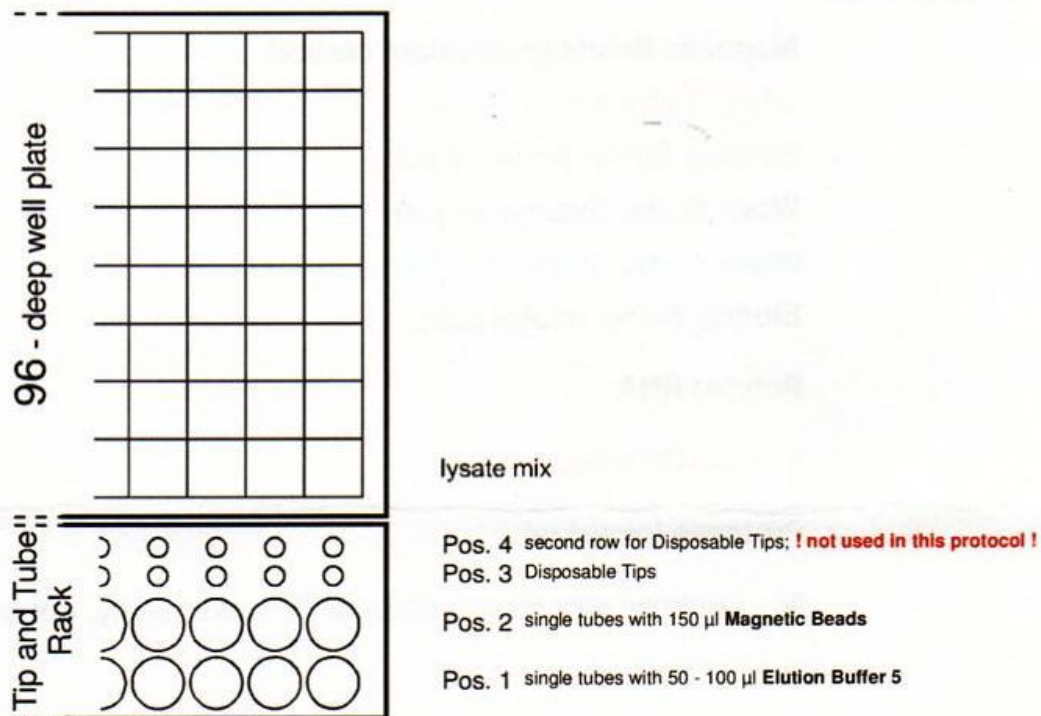
První pozice - zkumavky se 100 ul elučního roztoku

Druhá pozice - zkumavky se 150 ul roztoku magnetických částic

Třetí pozice - plastové špičky

Čtvrtá pozice – pro tento protokol se nepoužívá

Umístění vzorku



Obr.4 Umístění reagensů a vzorku
(<http://www.elisabeth.cz/chemagen>)

Vložíme desku (DWP) a stojánek (tip& tube rack) do přístroje. Ujistíme se zda jsou ve správné pozici, uzamkneme uzavřením bezpečnostní západky. Zavřeme kryt přístroje a zmáčkneme start.

Po ukončení izolace, přepipetujeme izolát do připravených mikrozkušavek.

Pokud s izoláty nebudeme ihned pracovat, uchovááme je v mrazícím boxu při -70°C.

7 Detekce:

Vlastní detekci provádíme na přístroji ABI 7300.

Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System je integrovaná platforma pro detekci a kvantifikaci nukleové kyseliny. Umožňuje provést analýzu exprese genů, detekce patogenu, SNP genotypizace, a plus / minus testy s vnitřní pozitivní kontrolou.

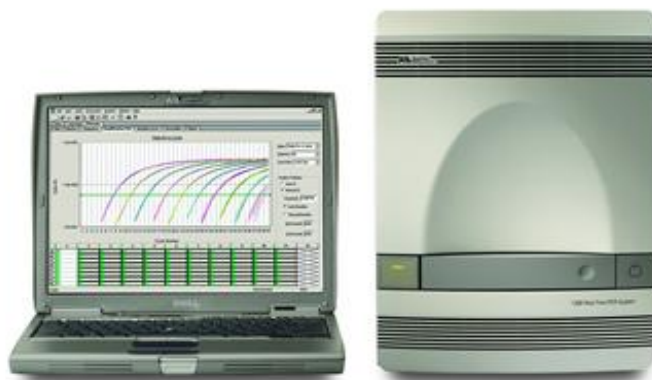
Real-time PCR kombinuje metodu tepelných cyklů, fluorescenční detekce a specifický software pro měření jednotlivých nahromaděných produktů PCR v jednotlivých cyklech reakce.

Kvantitativní výsledky jsou k dispozici bezprostředně po skončení PCR, bez nutnosti práce s gely, očištění PCR produktů, nebo používání post-PCR manipulací. Detekce Real-time PCR

trvá dvě hodiny, s použitím 96-ti jamkové desky nebo strypu (individuální nebo 8-jamkové), s objemem v rozmezí od 25 do 100 μ L. Ve srovnání s manuálními PCR kvantifikačními technikami, jako je např. Western blotting, nabízí real-time PCR enormní časové úspory, větší citlivost, vynikající přesnost, a větší dynamický rozsah [9].

Fluorescenční detekce

Všechny jamky v systému ABI 7300 jsou osvětleny wolfram-halogenovou lampou. Fluorescence emisí je detekována přes čtyři filtry na CCD aparát. Emisní filtry jsou optimalizovány pro použití s FAM[™] / SYBR[®] GREEN I, VIC[®] / JOE[™], TAMRA[™], ROX[™] fluorescenční barviva[10].



Obr. 5 Přístroj Applied Biosystems 7300
(<http://www.appliedbiosystems.com/abi7300>)

7.1 Detekční kit: MTB RT (EliGene):

7.1.1 Pracovní postup pro detekci DNA z izolovaného vzorku.

Kvalitativní diagnostický test určený k detekci *M.tuberculosis* z klinického materiálu nebo kultur.

Senzitivita - zachytí 10 genomových DNA v mastermixu.

Specifita: pozitivní výsledek pro *M. tuberculosis* a *M. bovis*, negativní výsledek pro *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M.avium*, *M. marinum*

7.1.1.1 Vybavení laboratoře:

Sterilní automatické pipety 5-20 ul

sterilní plastové špičky s filtrem pro DNA/RNA a Dnáz/Rnáz
sterilní stojánek

přístroj pro Real Time (Applied Biosystems 7300, 7500)

sterilní mikrozkušavky pro PCR

7.1.1.2 Obsah soupravy:

5 x 200 ul MTB Mix - amplifikační směs

4 x 50 ul PC DNA MTB - pozitivní kontrola

5 x 200 ul IC DNA MTB - vnitřní kontrola

7.1.1.3 Nastavení přístroje:

Teplotní profil

1 cyklus: 50°C 2 min.

1 cyklus: 95°C 1 min.

45 cyklů: 60°C 1 min.

95°C 15 s.

Detekce MTB - próba Yakima Yellow abs.525 nm - emise 548 nm

Detekce IC - próba FAM abs.494 nm - emise 518 nm

7.1.1.4 Skladování kitu:

Reagencie musí být přepravovány a uloženy při -20°C. Po jejich rozmražení znovu nezmrazovat a uchovávat při 4°C jen 14 dnů. Mastermixy jsou po rozmražení stabilní při 4°C dva týdny. Nekombinujeme reagenty různých šarží.

7.1.2 Pracovní postup:

Rozmrazíme MTB mix a po rozmražení napipetujeme 20 ul do amplifikačních mikrokumavek. V laminárním boxu přidáme 5 ul vyizolované DNA. Do kontrolních vzorků přidáme 5 ul pozitivní kontroly (PC DNA MTB) nebo 5 ul negativní kontroly. Mikrokumavky vložíme do přístroje a spustíme program.

8 Princip použité metody:

Real-time PCR:

Metoda je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce (PCR) přímo během reakce (tzv. „v reálném čase“) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace. Real-time PCR se provádí s pomocí přístrojů zvaných cyclery, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR.

Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je přímo či nepřímo úměrná množství amplifikátu přítomného v reakční směsi. Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vnesením naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu. Typická amplifikační křivka má esovitě zakřivený tvar a lze ji rozdělit na 3 části: 1) „background“ fázi kdy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot; 2) exponenciální fázi, kdy množství produktu exponenciálně roste (trvá asi 4-8 cyklů) a 3) fázi plató, kdy dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní. Platí, že čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popř. překročí určitý fluorescenční práh umístěný do této fáze, tím více startovních templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce [11].

Detekční systémy

Prvními látkami používanými pro detekci akumulace produktu během real-time PCR reakce byla interkalační barviva (*ethidium bromid*, *SYBR Green I*), jejichž fluorescenční aktivita vzrůstá po vazbě na dvouřetězcovou DNA. Vzhledem k tomu, že během PCR vzniká dvouřetězcový produkt, jehož množství zpravidla výrazně převyšuje počáteční množství dsDNA, lze pomocí interkalačních barviv sledovat průběh amplifikace.

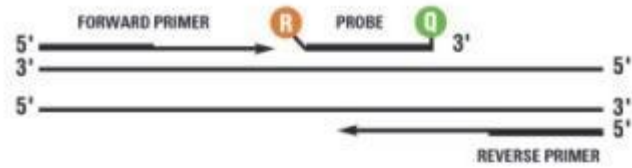
Velkou nevýhodou interkalačních barviv je skutečnost, že detekují veškerou dsDNA přítomnou v reakční směsi včetně nespecifických produktů amplifikace (jako jsou např. tzv. *primer-dimer artefakty*), které i při velmi pečlivé optimalizaci

metody velmi často vznikají. Specifita detekce je navíc dána pouze sekvencemi primerů.

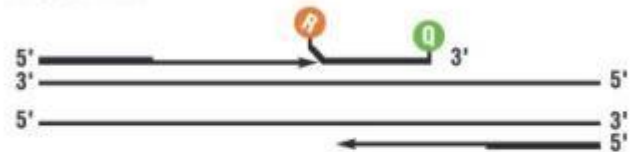
Elegantní řešení co se týče detekce nespecifických produktů nabízejí často využívané oligonukleotidové sondy. Jedná se o fluorescenčně značené oligonukleotidy, které hybridizují s určitou cílovou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu a výrazně přitom zvyšují svou fluorescenční aktivitu. Jejich výhodou je vysoká specifita, jelikož detekce cílové sekvence probíhá ve 2 stupních - na úrovni vazby primerů a rovněž na úrovni vazby sondy.

Specifické - sondy - ve své struktuře mají oligonukleotidový řetězec, kterým se hybridizují k PCR amplikonu. Pracují na principu FRET (fluorescence resonance energy transfer) mezi fluorescenčním barvivem (fluorofor - F nebo R) a zhášedčem (quencher - Q). Nárůst fluorescenční aktivity je způsoben zvýšením vzdálenosti mezi molekulou R a Q po rozštípnutí navázané sondy polymerázou - viz Obr.6 [11].

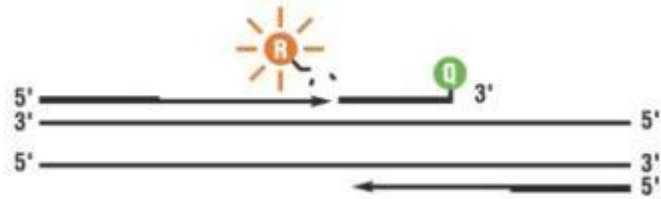
1. **Polymerizace:** Fluorescenční substrát (reporter - R) a jeho zhášec (Q) jsou navázány na 5' a 3' konce TaqMan sondy.



2. **Elongace řetězce:** Dokud je sonda intaktní záření emitované substrátem R je pohlcováno blízkým "zhášecem".



3. **Odštěpení:** když Tag polymeráza dorazí k začátku sondy, postupně ji odchlpuje až odštěpí fluorofor. Ten se tímto oddálí od zhášече a emitované světlo přestane být pohlcováno - detekovaná fluorescence stoupá.



4. **Polymerizace ukončena:** reporterová barva oddělená od zhášече emituje charakteristickou fluorescenci.



Obr. 6 Real Time PCR

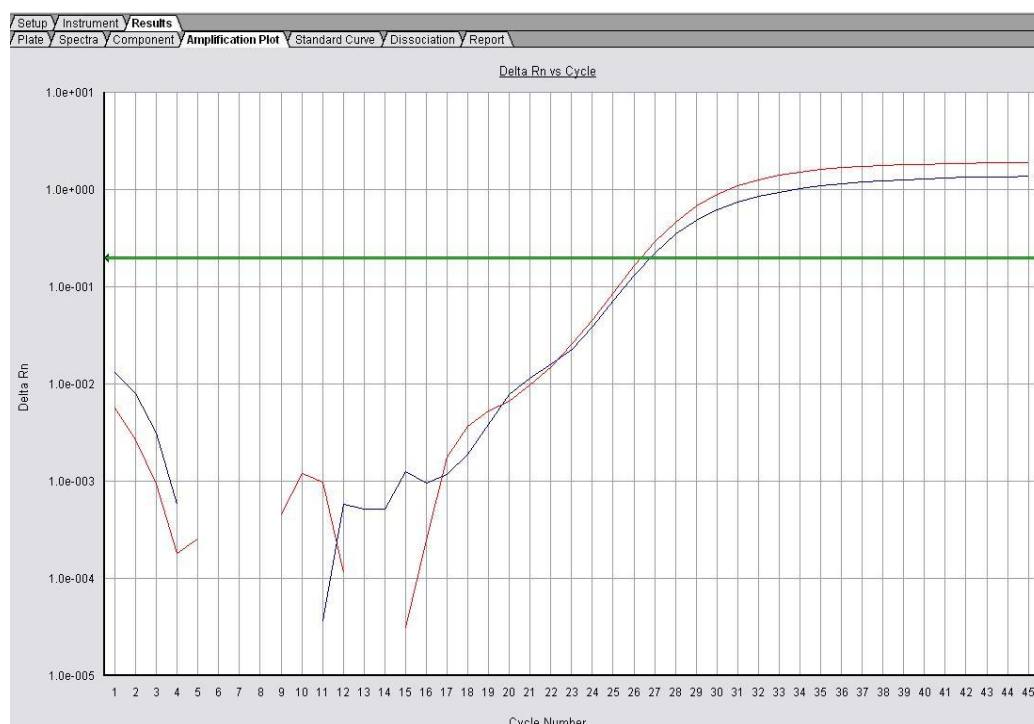
(<http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>)

Praktická část:

9 Odečítání výsledků:

9.1 Pozitivní výsledek:

Amplifikace a nárůst emisního spektra charakteristického pro Yakima Yellow (červená křivka). Při silné pozitivitě nemusí docházet k amplifikaci vnitřní kontroly (modrá křivka). Číselná hodnota v Ct udává kvantitu pozitivního výsledku. U každého pozitivního vzorku je nutné vyhodnotit tvar amplifikační křivky! Křivka má na svém počátku exponenciální tvar (strmě stoupá).



Obr.7 Pozitivní výsledek
(vlastní obrázek)

9.2 Negativní výsledek:

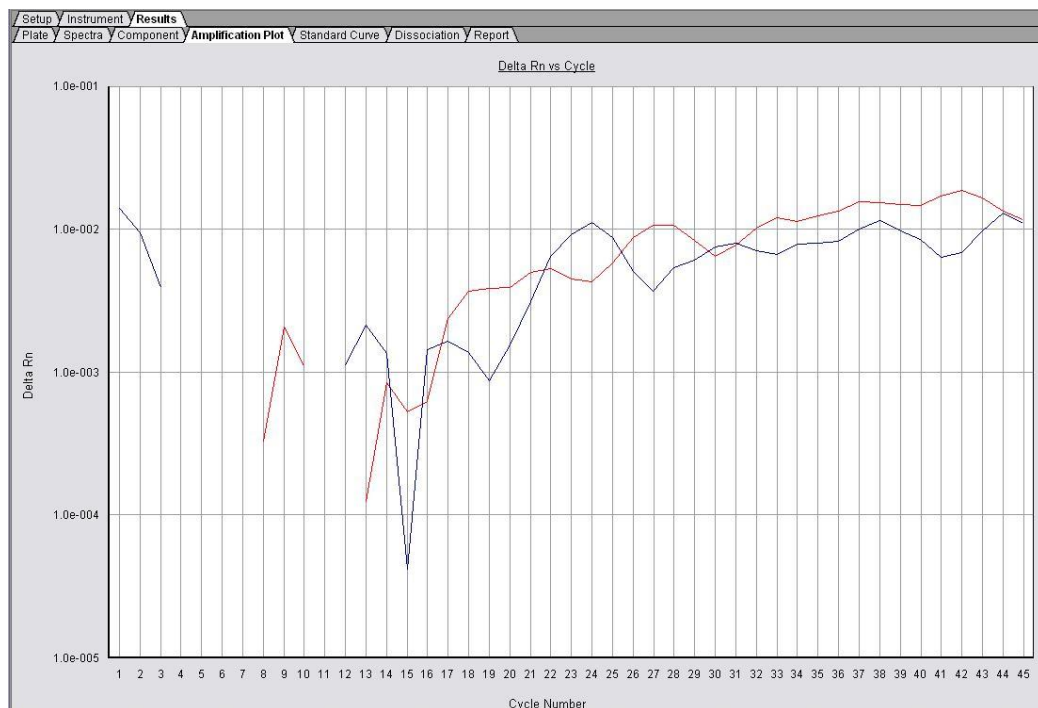
Nedochází k nárůstu emisního spektra pro Yakima Yellow (červená křivka) před 45 cyklem. U negativity dochází k amplifikaci vnitřní kontroly a nárůstu emisního spektra pro FAM (modrá křivka).



Obr.8 Negativní výsledek
(vlastní obrázek)

9.3 Inhibice reakce:

Nedochází k nárůstu emisního spektra pro Yakima Yellow ani k nárůstu emisního spektra pro FAM. V tomto případě je nutné analýzu zopakovat s nově izolovanými vzorky DNA.



Obr. 9 Inhibice PCR reakce
(vlastní obrázek)

9.4 Kontrola kvality:

9.4.1 Vnitřní kontrola:

Sleduje kvalitu izolace DNA a detekuje chyby v procesu izolace DNA, detekuje inhibice amplifikačního procesu. V případě negativního výsledku, Ct vnitřní kontroly musí mít hodnotu 35 nebo méně.

9.4.2 Pozitivní kontrola:

Upozorňuje na funkčnost mixu. Minimální Ct pozitivní kontroly musí mít hodnotu 28 nebo méně. Hodnoty vyšší než 28 nelze akceptovat a DNA detekci je nutné zopakovat.

9.4.3 Negativní kontrola:

Kontrola kontaminace při amplifikaci. Jako negativní kontrolu použít vodu pro molekulární biologii.

9.4.4 Řešení problémů:

1. Nedojde k amplifikaci vnitřní kontroly
 - a) jedná se o silně pozitivní výsledek - v případě že se zároveň amplifikuje MTB - není chyba
 - b) u negativního výsledku pro MTB jde o závadu v izolaci DNA, použití kitu po době expirace nebo závadu na přístroji pro Real Time
2. Neamplifikuje se pozitivní kontrola - použití kitu po době expirace nebo závadu na přístroji pro Real Time

9.4.5 Upozornění:

Při použití kitu hrozí nebezpečí vzniku falešně pozitivních výsledků způsobených kontaminací vzorků nebo falešně negativních výsledků způsobených špatným odběrem, transportem nebo zpracováním vzorků. Riziko těchto falešných výsledků nemůže být zcela vyloučeno nebo eliminováno. Získané výsledky musejí být interpretovány s ohledem na výsledky dalších laboratorních testů (kultivace, mikroskopie, atd.) a s ohledem na klinický stav pacienta.

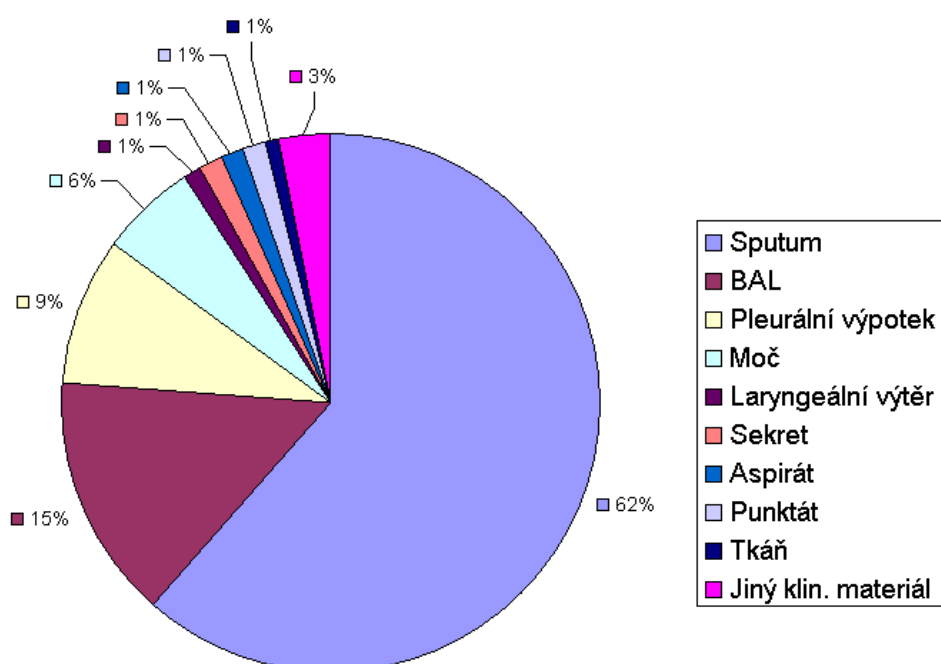
10 Výsledky :

Za období 2007- 2009 bylo souběžně vyšetřeno metodami :

Real-time PCR, klasická kultivace a MGIT: 1198 vzorků

Mikroskopicky: 1126 vzorků

Graf 1. Spektrum vyšetřovaných materiálů a jejich procentuální zastoupení



Nejčtenějším vyšetřovaným materiálem bylo sputum, které je zároveň i nejvhodnějším pro diagnostiku plicní formy tuberkulózy.

Tab. 1. Výsledky vyšetření metodou Real-time PCR EliGene MTB v systému ABI7300

Biologický materiál	Počet vyšetření	%	Pozitivní	%	Negativní	%	Inhibice reakce	%
Celkem	1198	100	13	1.1	1160	96.8	25	2.1
Sputum	734	61.3	8	0.7	722	60.3	4	0.3
BAL	177	14.8	0	0	170	14.2	7	0.6
Pleurální výpotek	105	8.8	3	0.2	98	8.2	4	0.3
Moč	72	6	0	0	67	5.7	5	0.4
Laryngální výtěr	14	1.1	0	0	14	1.1	0	0
Sekret	17	1.4	0	0	15	1.3	2	0.2
Aspirát	17	1.4	0	0	17	1.4	0	0
Punktát	15	1.2	2	0.2	13	1.1	0	0
Tkáň	12	1	0	0	11	0.9	1	0.1
Jiný klin.materiál	35	3	0	0	33	2.8	2	0.2

Vzorky s pozitivním výsledkem jsme konfirmovali metodami: mikroskopie, kultivace, MGIT.

Tab. 2. Porovnání pozitivních záchytů mykobakteriální DNA s výsledky získanými klasickými metodami

Číslo vzorku	Materiál	PCR	Mikroskopie	Kultivace	MGIT
1	sputum	pozitivní	pozitivní	pozitivní	sl. pozitivní
2	sputum	pozitivní	sl.pozitivní	kontaminace	negativní
3	sputum	pozitivní	pozitivní	pozitivní	sl.pozitivní
4	sputum	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní
5	pl. výpotek	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní
6	pl. výpotek	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní
7	sputum	pozitivní	negativní	pozitivní	sl.pozitivní
8	pl. výpotek	pozitivní	negativní	1-9 kolonií	negativní
9	sputum	pozitivní	negativní	sl. pozitivní	sl.pozitivní
10	sputum	sl.pozitivní	negativní	1-9 kolonií	negativní
11	punktát	pozitivní	pozitivní	pozitivní	kontaminace
12	sputum	pozitivní	pozitivní	pozitivní	sl.pozitivní
13	punktát	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní

10.1 Shrnutí výsledků vzorků

Všechny pozitivní záchyty mykobakteriální DNA byly následně potvrzeny klasickými metodami užívanými v diagnostice mykobakterií s pozitivním výsledkem.

Všechny negativní výsledky byly negativní i v ostatních metodách.

Molekulárně genetické metody podstatně zrychlují diagnostiku TBC a také zlepšují diagnostické možnosti u problematických materiálů.

Optimálních výsledků lze dosáhnout kombinací všech sledovaných metod, které se vzájemně doplňují.

11 Diskuze:

Tuberkulóza zůstává jako jedna z hlavních příčin nemocnosti a úmrtnosti lidí na celém světě. Rychlá a spolehlivá diagnostika mykobakteriální infekce je důležitá pro včasnou a správnou léčbu [12].

Předchozí studie ukázaly, že klasické testy používané pro identifikaci mykobakterií mohou mít často za následek chybnou identifikaci a podceňují rozmanitost rodu *Mycobacterium*. Byla proto zahájena studie porovnávající fenotypové a molekulární metody pro identifikaci mykobakterií. Pozornost byla věnována izolátům, které byly obtížně určitelné na úrovni druhu, a které přinesly neprůkazné výsledky testů provedených v rámci běžných rutinních laboratorních metod (růst, morfologie kolonií, pigmentace, biochemické testy). Molekulární identifikace byla provedena metodou PCR.

Do studie bylo zahrnuto celkem 34 izolátů, 13 izolátů odpovídalo stanovenému druhu a 21 izolátů odpovídalo dříve nepopsaným taxonům. U 20 izolátů byly pozorovány významné rozdíly mezi tradičními metodami a metodou molekulární typizace. Retrospektivní analýza dat ukázala, že k protichůdným výsledkům docházelo hlavně u chybných výsledků biochemického testu nebo jejich interpretace. Autoři studie došli k závěru, že molekulární typizace je nejen rychlejší (12 až 36 h versus 4 do 8 týdnů), ale také přesnější než tradiční metody [13] (Springer a kol.1996). Výsledky testování metody PCR v naší virologické laboratoři ZÚ se sídlem v Praze jsou podobné. Z 13 izolátů se s tradiční mikroskopií shoduje 6 izolátů s metodou MGIT také pouze 6 izolátů. Pozitivita se později potvrdila úplnou shodou s kultivačním vyšetřením. Metoda PCR se ukázala jako velice citlivá a spolehlivá.

V další studii autoři hodnotili výsledky vyšetření pomocí metody COBAS AMPLICOR PCR. Po dobu jednoho roku zjišťovali přítomnost *M. tuberculosis* v materiálech z dýchacích cest a ostatních klinických vzorcích zaslaných do laboratoře na testování *M. tuberculosis*. Na rozdíl od naší laboratoře se specializovali na plicní onemocnění, značná část klinických vzorků pocházela ze specializovaných center a nebyly respiračního původu. Celkem otestovali 1149 vzorků, z toho bylo 90 vzorků pozitivních tj, 7.8 %, nejčastěji ve sputu 15%, moči 10.5% a bronchiálním sekretu 9%, ale také v ostatních materiálech: biopsie 8.5 %, BAL 4.4%, mozkomíšní mok 3.8%, výtěr z HCD 2.1%. Nejčastěji vyšetřovaným materiálem byl BAL 33% (z celkového počtu vzorků), sputum 18% a mozkomíšní

mok 6.7%. Značné zastoupení měli i méně tradiční klinické materiály, jako např: žaludeční sekret 4.7%, aspirát z kostní dřevě 0.5 %, nebo stolice 6% [14] (Reischl a kol.,1998).

Naše výsledky se od výše uvedené studie liší. U přibližně stejného počtu vyšetřovaných klinických vzorků -1198 je 13 pozitivních tj:1.1%. Nejčastěji ve sputu 0.7%, pleurálním výpotku 0.2% a punktátu 0.2%, ostatní klinické materiály jsou u nás bez positivity. Nejčetnějším materiálem je sputum 61.3%, BAL 14.8% a pleurální výpotek 8.8% a moč 6%. Rozdíly mezi studii jsou zřejmě způsobeny tím, že naše laboratoř se nespécializuje na plicní onemocnění, ale provádí pouze rutinní testování *M. tuberculosis*.

Neměli bychom opomíjet ani ostatní mykobakteria, která jsou také klinicky významná, hlavně u imunosuprimovaných pacientů. V dnešní době jsou testy PCR zaměřeny buď na *M.tuberculosis* - pomocí specifické sekvence(jako je IS6110), nebo jsou zaměřeny na oblast společné mnoha mykobakteriálním druhům (např. 65 kDa antigen). Pak tyto testy vyžadují sekvenační nebo polymorfnní restriktce fragmentů pro identifikaci příslušných druhů. Vzhledem k tomu, že detekce DNA *M.tuberculosis* je vždy klinicky významná, přítomnost různých druhů ostatních Mykobakterií je třeba vykládat s velkou opatrností. Nicméně rutinní použití molekulárních testů prokázala, že ostatní mykobakteriální infekce jsou častější než se dříve myslelo, dokonce i u non-imunosuprimovaných pacientů [15].

Zavedení PCR real-time technologií umožňuje přesnou diagnostiku mykobakteriální DNA a může být použita i pro identifikaci druhů pomocí určování bodu tání nebo pomocí analýzy DNA sondou. Použití těchto testů v klinické mikrobiologii nabízí velkou příležitost pro zlepšení a zrychlení diagnostiky, především v důsledku zvýšené specifčnosti a nižším rizikem kontaminace. Budoucí úsilí by mělo být zaměřeno na standardizaci a kontrolu kvality používaných metod.

Zahraniční literatura nejčastěji doporučuje pro diagnostiku mykobakterií v plicních vzorcích: Mycobacterium tuberculosis direct Test (MTD) (Gen-Probe), COBAS AMPLICOR M. tuberculosis test (Roche Diagnostics) [16]. Použití vybrané metody záleží hlavně na stávajícím laboratorním zařízení a finanční náročnosti daných reagentů, proto jsme se v naší laboratoři odd.virologie ZÚ se sídlem v Praze rozhodli pro kit MTB RT (EliGene), který se testováním ukázal jako vyhovující našim podmínkám.

12 Závěr:

Laboratorní diagnostika mykobakteriálních infekcí obvykle trvá 1 až 8 týdnů.

Zvýšený výskyt tuberkulózy podnítil vývoj rychlých testů pro detekci *M.*

tuberculosis v klinických vzorcích.

Ve své práci jsem se zabývala jednou z nejnovejších diagnostických metod

posledního desetiletí, metodou PCR-real time. Při testování kitu MTB RT

(EliGene) jsem spolupracovala s odd. mykobakterologie ZÚ se sídlem v Praze, se

kterým naše virologické oddělení spolupracuje dlouhodobě. Testováním metody

PCR-real time pomocí kitu MTB RT (EliGene) jsme zjistili že je nejen

srovnatelná s klasickou metodou kultivace, ale daleko citlivější než námi

používané ostatní postupy (mikroskopie a metoda MGIT). Umožňuje rychlejší a

specifičtější diagnostiku, což může zrychlit a zkvalitnit léčbu mnoha pacientům.

Metoda nevyžaduje přílišnou manipulaci se vzorky, snižuje tak možnost

kontaminace jiných vzorků a je bezpečnější pro laboratorní pracovníky. Rozšiřuje

možnosti testování problematických a netypických klinických vzorků.

Metodu PCR – real time jsme zařadili do spektra námi používaných metod při

podezření na infekci *M. tuberculosis*.

13 Seznam literatury:

- [1] Votava M.a kol.:Lékařská mikrobiologie speciální.Neptun,Brno 2003.162 s
- [2] Votava M., Ondrovčík P.: Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie. Masarykova univerzita, Brno 1998. 90s
- [3] Votava M.: Lékařská mikrobiologie obecná. Neptun, Brno 2001.247s
- [4] Bednář M.,Fraňková V.,Schindler J., Souček A., Vávra J.: Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha 1996. 558 s
- [5] Havlík J., Göpfertová D., Marešová V., Roháčová H., Vaništa J.: Infekční nemoci.2., rozš. vyd. Galén, Praha 2002. 186 s
- [6] Kolektiv autorů: Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí, SZÚ Praha, Trios 1998
- [7] Bednář M.: Molekulárně genetické metody v rutinní mikrobiologické diagnostice. Remedia, Praha 1997
- [8] Návod na použití kitu MTB RT, EliGene, 2010
- [9] www.elisabeth.cz
- [10] www.appliedbiosystems.com
- [11] Pavlík E.: Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku, část 2,3,5, 1.LF UK, Praha 2001
- [12] World Health Organization: WHO report on the tuberculosis epidemic. WHO/TB/97.225. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2008
- [13] Springer, B., L. Stockman, K. Teschner, G. D. Roberts, and E. C. Bottger. 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. J. Clin. Microbiol.1996 34:296-303.
- [14] Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L.:Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens.J Clin Microbiol. 1998 Oct;36(10):2853-60.
- [15] Shrestha NK, Tuohy MJ, Hall GS, Reischl U, Gordon SM, Procop GW: Detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis and nontuberculous

mycobacterial isolates by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2003
Nov;41(11):5121-6

[16] Miller, N., T. Cleary, G. Kraus, A. K. Young, G. Spruill, and H. J. Hnatyszyn.: Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smear-positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 2002, 40:4143-4147.

13.1 Použité zkratky:

BAL – bronchoalveolární laváž

Ct - treshold

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DWP – izolační deska

EMB - ethambutol

FRET - fluorescence resonance energy transfer

G+C báze- guaninové + cytosinové báze

HCD – horní cesty dýchací

HCl - kys. chlorovodíková

IC – interní kontrola

INH – hydrazid kys. isonikotinové

LSS – laury sulfát sodný (dodecil sulfát sodný)

MGIT – Mycobacteria growth indicator tube

MTB – Mycobacterium tuberculosis

NALC - N-acetyl-L-cystein

NC – negativní kontrola

NK – nukleová kyselina

PC – pozitivní kontrola

Pl.punktát – pleulární punktát

PPD - z angl. purified protein derivatives

PZA - pyrazinamid

RMP - rifampicin

STM – streptomycin

SU – sputum

