

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Využití real-time PCR v diagnostice bakteriálních meningitid

(bakalářská práce)

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Hana Klusoňová Ph.D.

Školitel specialista: PharmDr. Lenka Plíšková (Ústav klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Hradec Králové)

Hradec Králové, 2007

Blažková Jana

Úvodem si dovoluji poděkovat vedoucí své diplomové práce PharmDr. Lence Plíškové a RNDr. Haně Klusoňové Ph.D. za odborné vedení, ochotu, cenné rady, připomínky a všestrannou pomoc při zpracování této práce.

Současně děkuji kolektivu laboratoře molekulární biologie Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové za umožnění provedení praktické části diplomové práce.

Závěrem bych chtěla poděkovat své rodině za to, že mi po celou dobu mého studia vytvářela skvělé podmínky a poskytla důležitou psychickou podporu.

OBSAH

OBSAH	3
ZKRATKY	5
1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDY.....	9
2.1.1. Primární bakteriální meningitidy.....	10
2.1.1.1. <i>Neisseria meningitidis</i>	10
2.1.2. Sekundární bakteriální meningitidy.....	11
2.1.2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
2.1.2.2. <i>Haemophilus influenzae</i>	13
2.1.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.1.3. Novorozenecké bakteriální meningitidy.....	15
2.1.3.1. <i>Escherichia coli</i>	15
2.1.3.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	16
2.1.4. Intrakraniální abscesy.....	17
2.1.5. Diagnostika bakteriálních meningitid.....	18
2.1.5.1. Mikrobiologické vyšetření.....	18
2.1.5.2. Biochemické vyšetření.....	18
2.1.5.3. Cytologické vyšetření.....	19
2.1.5.4. Hematologické vyšetření.....	19
2.1.5.5. Zobrazovací techniky.....	20
2.1.6. Léčba bakteriálních meningitid.....	20
2.1.7. Prevence bakteriálních meningitid.....	21
2.2. VYBRANÉ MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY.....	22
2.2.1. Izolace nukleových kyselin.....	22
2.2.2. Amplifikační metody.....	23
2.2.2.1. Polymerázová řetězová reakce.....	23
2.2.3. Gelová elektroforéza.....	27
2.2.4. Kontrola kvality.....	28
2.2.4.1. Pozitivní kontrola amplifikace.....	28
2.2.4.2. Negativní kontrola amplifikace.....	29

2.2.4.3. Inhibiční kontrola amplifikace.....	29
2.2.5. Technologie real-time PCR.....	31
2.2.5.1. SYBR Green.....	31
2.2.5.2. Hybridizační FRET sondy.....	34
2.2.5.3. Hydrolytické sondy.....	36
2.2.5.4. Molekulové signály.....	39
2.2.6. Real-time PCR cykly.....	39
3. EXPEDIMENTÁLNÍ ČÁST, VÝSLEDKY.....	42
3.1. IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA.....	42
3.2. AMPLIFIKACE VYIZOLOVANÉ DNA.....	43
3.2.1. Průkaz DNA <i>N. meningitidis</i> metoda standardní PCR.....	43
3.2.2. Průkaz DNA <i>S. pneumoniae</i> metoda standardní PCR.....	45
3.2.3. Průkaz DNA <i>H. influenzae</i> metoda standardní PCR.....	47
3.2.4. Průkaz DNA <i>S. aureus</i> metoda standardní PCR.....	49
3.2.5. Průkaz DNA <i>E. coli</i> metoda standardní PCR.....	52
3.2.6. Průkaz DNA <i>L. monocytogenes</i> metoda nested PCR.....	54
3.3. OPTIMALIZACE REAL-TIME PCR PRO PRŮKAZ DNA	
<i>S.aureus</i>	57
3.3.1. Optimalizace Mg ²⁺ kationtů.....	61
3.4. VALIDACE REAL-TIME METODY.....	65
3.4.1. Opakovatelnost měření.....	65
3.4.2. Reprodukovatelnost měření.....	66
3.4.3. Citlivost – senzitivita real-time PCR.....	66
3.5. VÝSLEDKY.....	71
4. DISKUZE.....	75
5. ZÁVĚR.....	80
6. LITERATURA.....	80

ZKRATKY:

A	adenin
bp	páry bází
C	cytozin
CNS	centrální nervový systém
CSF	mozkomíšní mok (z angl. cerebrospinal fluid)
CP	crossing point
Ct	treshold cyklus
CV	variační koeficient
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
dNTPs	deoxyribonukleosidtrifosfáty
dTTP	deoxythymidintrifosfát
dUTP	deoxyuridintrifosfát
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	ethidium bromid
FRET	fluorescenčně rezonanční přenos energie (z angl. fluorescence resonance energy transfer)
G	guanin
HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
IC	inhibiční kontrola
LC	LightCycler
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
LC red 640, 705	Lightcycler Red 640, 705
MM	MasterMix
NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate-buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
rRNA	ribozomálně ribonukleové kyseliny (z angl. ribosomal RNA)

SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	směrodatná odchylka
SP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
T	thymin
T _m	teplota tání (z angl. melting temperature)
Tris	Tris(hydroxymetyl)aminometan
Taq DNA polymeráza	DNA polymeráza z <i>Thermus aquaticus</i>
U	uracil
ÚKBD	Ústav klinické biochemie a diagnostiky

1. ÚVOD

Bakteriální meningitidy jsou velkým celosvětovým problémem a zůstávají pro lékařskou veřejnost neustálou výzvou, protože doposud 10 – 20% nemocných tomuto onemocnění podléhá.

Prognóza je závislá na včasnosti etiologické diagnózy a okamžitém zahájení adekvátní léčby. Pozdní rozpoznání meningitidy (především u novorozenců) vede k nevratným změnám na CNS, které jsou buď neslučitelné se životem nebo zanechávají trvalé následky (1).

Diagnostika bakteriálních meningitid se opírá o klinický obraz, provedení lumbální punkce a laboratorní vyšetření mozkomíšního moku, a to cytologické, biochemické a mikrobiologické. Mikrobiologická diagnostika je zcela zásadní pro určení etiologického agens a tím zahájení zcela specifické kauzální antibiotické terapie.

Obecně lze konstatovat, že objasněnost bakteriálních meningitid pomocí klasických mikrobiálních technik (tj. mikroskopie, kultivace, hemaglutinace) dosahuje přibližně 70%. Poměrně vysoké procento bakteriálních meningitid tedy zůstává diagnosticky neobjasněno.

Do mikrobiologické diagnostiky v posledních letech stále více pronikají molekulárně biologické metody. Jejich nástup začal v 90. letech dvacátého století. Jedná se o diagnostické postupy založené na molekulárně biologických technikách, které se snaží detekovat jeden či více úseků nukleové kyseliny s takovým pořadím bazí, které je pro hledaného mikroba zcela typické. Nález takové struktury v infekčním materiálu může být poté považován za důkaz přítomnosti mikroba v pacientově organismu. Tyto techniky umožňují přímou detekci původce onemocnění v klinických vzorcích bez nutnosti kultivace. Jejich výhodou je vysoká specifita, citlivost, a především rychlost analýzy (2).

Úkolem molekulárně biologických technik v diagnostice bakteriálních meningitid je zvýšit objasněnost nejčastějších etiologických agens *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, které vyvolávají zhruba 90% všech bakteriálních meningitid (2,3).

Tato práce se zabývá především primárními a sekundárními bakteriálními meningitidami a jejím cílem je:

- 1) zjistit nárůst pozitivních průkazů nejčastějších původců bakteriálních meningitid v letech 2003 - 2006 pomocí molekulárně biologických metod
- 2) zpracovat výsledky PCR průkazů zejména u těchto původců:
 - *Neisseria meningitidis*
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Haemophilus influenzae*
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Escherichia coli*
 - *Listeria monocytogenes*
- 3) zavedení real-time PCR pro průkaz DNA *Staphylococcus aureus*

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. BAKTERIÁLNÍ MENINGITIDY

Bakteriální meningitidy jsou závažná onemocnění centrálního nervového systému. CNS je strukturními i funkčními mechanismy dobře chráněn proti patogenním vlivům. Bakteriální agens jsou jedním z možných původců tohoto onemocnění.

Meningitidy bakteriálního charakteru jsou akutní i chronická onemocnění postihující mozkové obaly. Akutní meningitidy jejichž původci jsou bakterie, se klinicky manifestují jako purulentní meningitidy, oproti virovým meningitidám, které se manifestují jako aseptické. Purulentní meningitida je způsobena pyogenními bakteriemi.

Mezi nejčastější původce bakteriálních meningitid patří *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, dále potom *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. Nejčastějšími původci u novorozenců jsou *Escherichia coli* a *Streptococcus agalactiae*. Bakterie *Neisseria meningitidis* ohrožuje zejména mladé osoby. Zároveň mohou být všechny věkové kategorie ohroženy pneumokoky, stafylokoky, streptokoky a dalšími mikroorganismy (1).

Mechanismus vzniku je nejasný. Může jít o hematogenní či lymfogenní cestu ze vzdáleného primárního fokusu, z okolí při otitis media či při sinusitidách, ale i o infekci při otevřených traumatech hlavy.

Bakteriální záněty mozku a mozkových blan s výrazným hnisavým nálezem v mozkomíšním moku dělíme na (1):

- primární záněty mozkových blan
- sekundární záněty mozkových blan
- novorozenecké meningitidy
- intrakraniální abscesy

2.1.1. Primární bakteriální meningitidy

Vyskytují se po celém světě, v epidemiích se častěji vyskytují na africkém kontinentě a v jižní Americe.

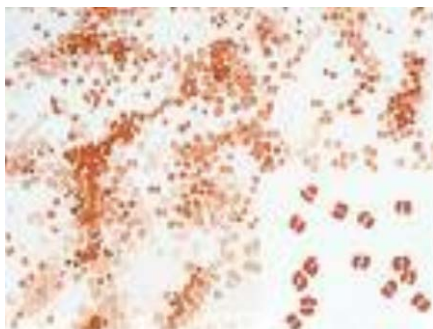
Etiologie:

Etiologickým agens jsou nejčastěji *Neisseria meningitidis*, dále lze prokázat *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*.

2.1.1.1. *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis je gramnegativní diplokok, který má tvar žemle (viz. obrázek č.1), v likvoru je uložený intracelulárně a snadno podléhá autolýze. Je značně citlivý na vnější vlivy a většinu antibiotik. Za druhovou specifitu jsou zodpovědné polysacharidy bakteriálního pouzdra. Do současné doby bylo odlišeno 13 sérotypů (A, B, C, D, X, Y, Z, 29 E, W-135, H, I, K, L))(1).

Obr.č.1. *Neisseria meningitidis* – barvení podle Gramma (4)



Patogeneze:

Zdrojem je výhradně nemocný člověk nebo bacilonosič. Vstupní branou je nosohltan a krevní cestou se bakterie dostává do mozkomíšních blan prostřednictvím plexus choroideus.

Klinický obraz:

Inkubační doba se pohybuje mezi 2 - 10 dny. Po 1 - 2 dnech (někdy i po několika hodinách) se objevují necharakteristické příznaky připomínající více či méně akutní respirační onemocnění. Dochází k vzestupu horečky, objevují se silné bolesti hlavy s nauzeou event. opakovaným zvracením. Při těžším

průběhu dochází k rychlému zastření vědomí, deliriu až bezvědomí. U malých dětí je doprovázeno celkovými křečemi.

Při objektivním vyšetření zjišťujeme meningeální příznaky. Dochází k různě vyjádřenému dráždění vegetativního nervového systému, zarudnutí tváří, pocení. Na kůži se objevují petechie, zejména na břiše, hrudníku a končetinách. U těžkých průběhů se petechie nachází po celém těle a přechází do značných hemoragií. Dochází k poruchám funkce mozkových nervů. Dojde-li k postižení na začátku (v prvních hodinách) onemocnění, dochází často k ireverzibilnímu postižení (hluchota, slepota, ztráta čichu). Těžkou komplikací je uzávěr likvorových cest, který vyžaduje okamžitý chirurgický zákrok.

Jako následky prodělané meningitidy mohou vzniknout hlavně u dětí psychomotorické retardace, epileptické záchvaty a změny chování. Ložiskové následky se mohou objevit vznikem cévní mozkové afekce, tromboflebitidy a arteritidy, které způsobují ischemické léze. Následky po prodělané meningitidě přetrvávají u 15 - 17% pacientů. Letalita se pohybuje kolem 5 - 10%. (1, 5)

Zvláštní formou onemocnění je Waterhousův – Friderichsenův syndrom charakterizovaný postižením kůry nadledvin.

Patogeneze meningokokové sepse:

Endotoxin *N. meningitidis* aktivuje makrofágy, které produkují tumor necrosis faktor (TNF). Interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6). Tyto cytokiny u těžce probíhajících meningokokových infekcí se tvoří do vysokých hodnot a hrají důležitou roli v mechanismu obrany hostitele. Jejich působením dochází k poruše cirkulace, postižení termostatického centra, horečkám, k vyčerpání funkce jater a kostní dřeně, k poklesu kyslíku ve tkáních, ke vzniku edému a k acidóze. Následkem je selhání funkcí ledvin, jater a plic.(1)

2.1.2. Sekundární bakteriální meningitidy

Vyskytují se po celém světě.

Etiologie:

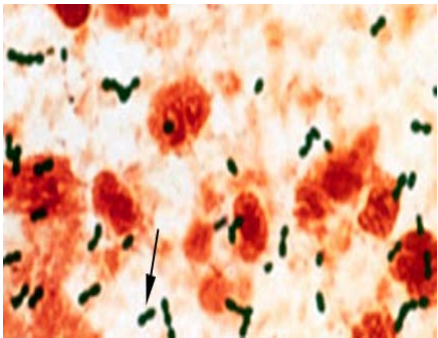
Hlavními vyvolavateli sekundárních meningitid jsou především *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*.

V průběhu endokarditidy může jako komplikace vzniknout meningitida, která je vyvolána převážně mikroblem *Staphylococcus aureus*, méně často *S. epidermidis* (1).

2.1.2.1. Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae je grampozitivní, nepohyblivý, nesporulující diplokok sférického až oválného tvaru (viz. obrázek č.2). Jeho patogenita je dána polysacharidem pouzdra. Patogenní jsou proto jen opouzdřené kmeny, které rostou v S - koloniích, produkují toxiny - pneumolysin, neuramidázu a princip vyvolávající purpuru. Podle kapsulárního polysacharidu lze určit 84 sérotypů, z nichž prvních 23 vyvolává 90% lidských nákaz (1,5).

Obr.č.2. *Streptococcus pneumoniae* – barvení podle Gramma (6)



Patogeneze:

K přenosu dochází krevní cestou z nitrolebečních ložisek, jako jsou otitidy, mastoiditidy, sinusitidy nebo přímo otevřeným zraněním.

Klinický obraz:

Postižení jsou zpravidla dospělí. Meningitida se rozvíjí pomaleji než meningokoková meningitida. V předchorobí nemocných se objevují opakované záněty středouší, vedlejších dutin event. úraz hlavy. Tyto infekty chronického charakteru probíhají obvykle bez příznaků, občas s bolestmi hlavy, výtokem

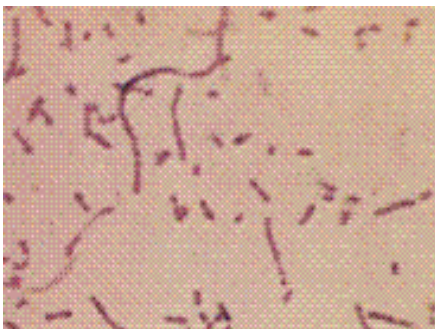
z ucha. Přejde-li zánět na měkké pleny, stoupá horečka, bolest hlavy, zvracení a vyvíjí se meningiální syndrom.

Jedná-li se o přímý prostup infekce z ložiska je vývoj rychlý. Nemocný je během několika hodin v bezvědomí s vysokou horečkou, je meningiální, event. se mohou objevit křeče. Při těžkém průběhu hrozí vznik mozkového abscesu, který bývá nejčastěji odstraněn chirurgicky. Pokud se nepodaří izolovat primární ložisko dochází k opakovaným meningitidám. Jako následky mohou vzniknout poruchy hlavových nervů, které mohou vést k hluchotě, slepotě a u dětí k psychomotorické retardaci. Letalita je vysoká až 20%. (1,5)

2.1.2.2. *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae je gramnegativní nepohyblivý, nesporulující mikrob, který má kulovitý až vláknitý tvar (viz. obrázek č.3). Podle kapsulárního antigenu rozlišujeme 6 typů (a - f). Nejvirulentnější je typ b, který vyvolává většinu systémových onemocnění. Neopouzdržené kmeny způsobují nová vzplanutí chronických zánětů dýchacích cest, vedlejších dutin a středouší. (1,5).

Obr.č.3. *Haemophilus influenzae* – barvení podle Gramma (7)



Patogeneze:

Přenos se děje vzdušnou cestou. Mikroby prostupují submukózou horních cest dýchacích do krve a krevní cestou dochází k postižení orgánů (meningitida, epiglotitida).

Klinický obraz:

Meningitida vyvolaná *Haemophilus influenzae* postihuje nejčastěji děti od 3 měsíců (novorozenci jsou pravděpodobně chráněni pasivně získanými

protilátkami od matky) do 5 let. Na začátku se objevuje nevýrazná infekce dýchacích cest, horečka, zvracení, neklid až nespavost, nechutenství. Postupně se vyvíjí typický nález. U malých dětí vyklenutí fontanely, u větších dětí pozitivní meningeální příznaky, event. bezvědomí a křeče. Jestliže meningitida postihne děti do 1 roku, dochází k ucpání mozkových cest s následným hydrocefalem. Často vznikají subdurální výpotky, vyžadující chirurgický zákrok. Letalita je do 5% (1,5).

2.1.2.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je grampozitivní kok, který se vyskytuje jednotlivě nebo v nepravidelných shlucích (viz.obrázek č. 4), nejagresivnější ze všech stafylokoků. Kmeny produkující toxin – enterotoxin 6 mohou vyvolat syndrom toxického šoku.

Jako ostatní stafylokoky je nadaný řadou vlastností: odolností proti nepříznivým vlivům prostředí, relativně snadným vznikem rezistence na antibiotika, schopností intracelulárního přežívání (1,5,9).

Obr.č.4. *Staphylococcus aureus* – barvení podle Gramma (8)



Patogeneze:

Zdrojem infekce je člověk, a to nemocný s hnisavým drénovaným ložiskem nebo asymptomatický nosič. Výskyt nosičství je vyšší u zdravotnického, zvláště nemocničního personálu a u déle hospitalizovaných pacientů. Cesta přenosu infekce je přímá i nepřímá, v nemocničním prostředí je nejdůležitější přenos infekce rukama personálu. V terénu se stafylokokové infekce vyskytují sporadicky, v nemocnicích nejsou výjimkou místní epidemie.

Klinický obraz:

K nejčastějším klinickým projevům patří ranné infekce a pyodermie. Hnisavá meningitida je vzácná a obvykle se objevuje jako pooperační či poúrazová komplikace, vzácně může být metastatickým projevem při sepsi či vzniknout přestupem z hnisavého procesu na povrchu lebky (1,5).

2.1.3. Novorozenecké meningitidy

Etiologie:

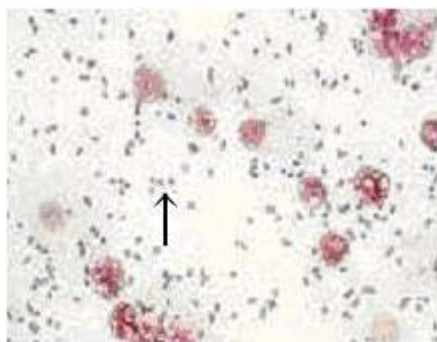
U novorozeneckých meningitid se uplatňuje snížená schopnost obrany. Onemocnění se vyskytuje od 1. dne až do 4. týdnů života novorozence.

Nejčastějšími vyvolavateli jsou streptokoky skupiny B a *Escherichia coli*, méně často *Listeria monocytogenes*.

2.1.3.1. Escherichia coli

Escherichia coli je gramnegativní nesporulující pohyblivá tyčinka s bičíky (viz. obrázek č. 5). Zatím je známo 163 antigenů K a 53 antigenů H. Mikrob je termolabilní, je normální součástí bakteriálního obsahu střeva lidí a zvířat (1,5).

Obr.č.5. *Escherichia coli* – barvení podle Gramma (10)



Patogeneze:

K infekci dochází buď v průběhu porodu (vdechnutím plodové vody při porodu) nebo je zdrojem infekce zevní příčina (nedostatečně dobře umyté ruce

ošetřujícího personálu, infikované dudlíky, savičky, nedostatečná hygiena kůže při kojení). Zdrojem infekce bývá často matka.

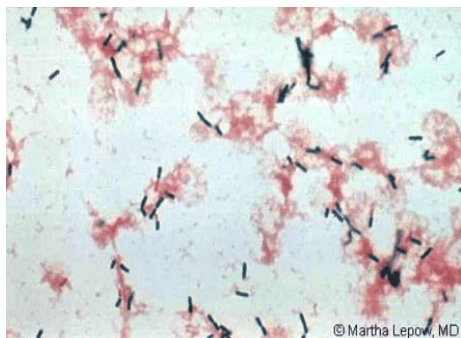
Klinický obraz:

Je zcela odlišný od ostatních bakteriálních meningitid. Novorozenec je apatický, odmítá pití, je hypotonický (může být i hypertonický). Teploty nebývají zvýšené, naopak může dojít k hypotermii. Chybí meningeální příznaky i vyklenutí fontanely. Často současně probíhá infekce močových cest. Nejzávažnější a nejčastější komplikací je vznik hydrocefalu. U jednotlivého bloku likvorových cest je nutné provést chirurgický zákrok, jinak je rekonvalescence provázena poruchami vidění, sluchu a psychomotorickou retardací těžkého stupně. Letalita je kolem 30 - 40% (1,5).

2.1.3.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je grampozitivní tyčka se zaoblenými konci (viz. obrázek č. 6), odolná vůči zevním vlivům. Vyskytuje se v několika sérotypech (1,5,9).

Obr č.6. *Listeria monocytogenes* – barvení podle Gramma (11)



Patogeneze:

Zdrojem nákazy mohou být zvířata, výkaly, odpadní vody. Kromě uvedených možností mohou být zdrojem nákazy i zdraví nosiči v lidské populaci. Jistý je přenos placentou na plod, možná je i nákaza v porodních cestách, ale i od ošetřujícího personálu novorozeneckých oddělení.

Klinický obraz:

Listerióza gravidních je velice závažná. Může probíhat inaparentně, jako lehké horečnaté onemocnění nebo jako cystopyelitida. Z matky se může nákaza placentárně přenést na plod a dojde buď k potratu či porodu mrtvého plodu, nebo k porodu (většinou předčasnému) dítěte, u kterého se projeví jako onemocnění granulomatosis infantiseptica. Na kůži, sliznicích a orgánech novorozence jsou drobné granulomy s nekrózou, ve kterých je spousta listerií. Novorozenec je dušný, trpí poruchami termoregulace a záchvaty křečí. I při okamžité léčbě antibiotiky umírá asi polovina postižených novorozenců záhy po narození.

Dojde-li k nákaze v porodních cestách, rozvine se koncem prvního týdne po porodu obraz hnisavé meningitidy (1,5).

2.1.4. Intrakraniální abscesy

V průběhu bakteriálních meningitid mohou vzniknout jako komplikace intrakraniální abscesy. Lokalizace abscesů může být různá. Při meningitidách ušního původu postihuje oblast laloku spánkového nebo mozečkovou hemisféru, při zánětech vedlejších dutin obličejových a u zlomenin spodiny lební postihuje převážně čelní lalok.

Etiologie:

V průběhu bakteriálních meningitid záleží na základním ložisku. Při zánětech ušních a u fraktur lebních kostí u dospělých je vyvolavatelem především *Streptococcus pneumoniae*, u dětí *Haemophilus influenzae*, méně často *Streptococcus pneumoniae*. Při bakteriálních meningitidách je nejčastějším vyvolavatelem *Staphylococcus aureus* (1).

Klinický obraz:

V průběhu meningitidy u akutního abscesu přetrvávají místní i celkové příznaky jako je bolest hlavy, horečka, epileptické záchvaty, porucha vědomí. U chronického průběhu se absces vyvíjí pomalu, opouzdří se a může být klinicky zcela němý, event. později se může vyvíjet jako expanzivní proces. Každý

abces hrozí vždy perforací, nejčastěji do komorových prostor, s okamžitou smrtí (1).

2.1.5. Diagnostika bakteriálních meningitid

Diagnostika bakteriálních meningitid se opírá o klinický obraz, především o provedení lumbální punkce a vyšetření mozkomíšního moku. Cílem vyšetření CSF u pacientů s podezřením na neuroinfekci je v první řadě vyloučení či průkaz přítomnosti neuroinfekce a dále pak určení charakteru zánětlivého procesu v CNS, jeho dynamiky a přidružených komplikací (1).

2.1.5.1. Mikrobiologické vyšetření

Přímý průkaz původce bakteriálních meningitid se opírá o mikroskopické vyšetření nátěru z mozkomíšního moku a kultivace původce. Vzhledem k rozsahu možných původců je nutné použít širokou sestavu půd a kultivačních technik. CSF lze kultivovat i v hemokultivačních nádobkách. Odběr CSF je nutné provést před zahájením léčby antibiotiky a co nejrychleji doručit do laboratoře.

V případě zavedení léčby antibiotiky před odběrem CSF izolace selhává. Pak lze původce prokázat pomocí latex – aglutinačního testu, pokud se jedná o meningokoky, hemofily event. *Escherichia coli* (1).

Rozvoj molekulárně biologických metod, které v posledních deseti letech do mikrobiologické diagnostiky stále více pronikají, se zdá velmi perspektivní pro další zpřesnění diagnózy. Diagnostika pomocí PCR je vůči mikroskopickým metodám citlivější, vůči kultivačním metodám rychlejší a umožňuje prokázat původce onemocnění i po zahájení léčby antibiotiky (12).

2.1.5.2. Biochemické vyšetření

Spektrum biochemických vyšetření je velice široké. Vždy se provádí vyšetření základních parametrů: hladina celkové bílkoviny, chloridu sodného, laktátu, glukózy, imunoglobulinů a albuminu. Stále větší význam má vyšetření hladin proteinů akutní fáze. U každého likvoru by se mělo provést vyšetření

spektrofotometrické, které podává informace a přítomnosti hematogenních pigmentů.

U bakteriálních meningitid nacházíme hodnoty glukózy značně snížené. Hodnoty chloridů bývají v normě nebo lehce snížené, hodnoty bílkovin se pohybují v gramových hodnotách. Bakteriální meningitidy a encefalitidy způsobují vzestup laktátu v likvoru (1).

2.1.5.3. Cytologické vyšetření

Při cytologickém vyšetření je pozornost zaměřena na buněčnost a buněčnou skladbu CSF. Buněčnost CSF je zjišťována odečtem počtu erytrocytů v nativním CSF a leukocytů v CSF obarveném fuchsinem ve Fuchsově - Rosenthalově komůrce. Je vyjadřována počtem příslušných elementů na 3,2 ml CSF. Diferenciaci elementů se provádí na úrovni rozlišení leukocytů a erytrocytů. Prováděná diferenciace na mononukleáry a polymorfonukleáry se nedoporučuje s ohledem na riziko získání chybných výsledků. Buněčnou skladbu CSF je možné vyšetřit až odečtením trvalého cytologického preparátu připraveného citlivou cytosedimentační metodou či méně citlivou cytocentrifugací a obarveného základním barvením dle Maye - Grünwalda, případně některou z řady speciálních barvicích technik (13, 14,15).

Normální cytologický obraz CSF, vyjma CSF novorozenců, je představován buněčností do 10/3 leukocytů s přibližným poměrem lymfocytárních k monocytárním elementům 7 : 3 a s tolerancí do 10 % aktivovaných lymfocytů. Přítomnost dalších elementů je fyziologicky nepřijatelná (13,14,16).

Zvýšená buněčnost CSF je označována jako pleiocytóza a normální buněčnost, ovšem s patologickou skladbou buněk, jako patologická oligocytóza s přívlastkem odpovídajícím dominující buněčné linii. Výjimkou jsou nádorové infiltrace meningitid, kdy je tumorózní pleiocytóza, resp. oligocytóza popisována i při zcela minoritním zastoupení nádorových elementů v CSF (13,14,16).

2.1.5.4. Hematologické vyšetření

Hematologické metody spočívají ve vyšetření krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem bílých krvinek a sedimentací.

U bakteriálních meningitid krevní obraz vykazuje leukocytózu s výrazným posunem doleva (k tyčím). Sedimentace erytrocytů je zvýšená (1).

2.1.5.5. Zobrazovací diagnostické techniky

Zobrazovací diagnostické metody patří u infekčních nitrolebních procesů k základním vyšetřením. Lze jimi diagnostikovat některé projevy kalcifikací, změny ve struktuře kostí a u hnisavých intrakraniálních procesů primární zdroj.

Z klasikých metod je to angiografie, neinvazivní vyšetření diagnostickým ultrazvukem, které se uplatňuje zejména u kojenců a malých dětí. Dále potom výpočetní tomografie, která napomáhá k rozlišení mezi intracerebrální a extracerebrální lokalizací infekčních nitrolebních onemocnění.

Stále větším přínosem v diagnostice onemocnění CNS je vyšetření magnetickou rezonancí, které umožňuje zachytit i velmi malé změny v mozkové tkáni a přímo zobrazit intrakraniální cévní systém (1).

U bakteriálních meningitid prokazují elektroencefalografická vyšetření nejčastěji difúzně abnormální záznam (u prim.meningitid). Pokud se objeví fokální nález, je nutné doplnit elektroencefalografické vyšetření počítačovou tomografií (CT). V případech abnormálních nálezů je nutné vyšetření opakovat, eventuelně doplnit vyšetřením prostřednictvím nukleární magnetické rezonance (1).

2.1.6. Léčba bakteriálních meningitid

Nemocný je v prvních hodinách ohrožen edémem mozku, proto se ihned podávají kortikosteroidy v rychlé infuzi po dobu nejvýše pěti dní.

Při léčení se vychází z předpokladu, že většina bakteriálních meningitid je vyvolána *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae* a po přijetí se podávají základní širokospektrá antibiotika, ampicilin (dětem) a chloramfenikol (dospělí) ve vysokých dávkách. U novorozeneckých meningitid a u gramnegativních původců se podávají cefalosporiny 3. generace (1).

Pokud je pozitivní mikroskopické vyšetření a pozitivní izolace vyvolavatele, je snaha o zavedení cílené terapie podle původce a jeho citlivosti na léčbu antibiotiky. Úspěch léčby se kontroluje jednak zlepšujícím se stavem

nemocného, jednak opakovaným provedením lumbální punkce a vyšetřením mozkomíšního moku.

Při zjištěné rezistenci na jednotlivé původce se mění léčba antibiotiky.

U intrakraniálních abscesů se indikuje okamžitá chirurgická léčba, protože nemocný je ohrožen perforací abscesu do komorového systému a okamžitou smrtí (1).

2.1.7. Prevence bakteriálních meningitid

V prevenci bakteriálních meningitid existují vakcíny u hemofilových onemocnění. Program vakcinace není jednotný, imunita po očkování má trvání 4 - 5 let (1).

U pneumokokových onemocnění se provádí očkování polyvalentní vakcínou (Pneumo 23, Pasteur Merieux) s trváním imunity 5 let (1).

V prevenci meningokokových nákaz se aplikuje dvousložková polysacharidová vakcína A+C (Pasteur Merieux). Po jedné dávce trvá imunita 3 roky (1).

Proti onemocnění meningokokem typu B nebyla doposud vyrobena žádná spolehlivá vakcína (1).

2.2. VYBRANÉ MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY

V devadesátých letech dvacátého století začal mohutný rozvoj molekulárně biologických metod, které postupně pronikají do mikrobiologické diagnostiky. Jsou používány pro svou rychlost, specifitu a citlivost, přispívají k rychlému stanovení diagnózy a podílí se na sledování průběhu onemocnění a uzdravení pacienta (17, 18).

Bylo popsáno velké množství metodik, které jsou užitečné v různých diagnostických situacích. Každá z těchto metodik se odlišuje od ostatních v požadavcích na vzorek, v jeho přípravě, v pracnosti a náročnosti provedení, v citlivosti a specifitě. Diagnostické metody založené na molekulárně biologických metodách zpravidla zahrnují pokus o nalezení pro vyvolavatele specifického úseku (úseků) nukleové kyseliny, který je pro hledaného patogena zcela typické. Nález takové struktury v infekčním materiálu může být považován za důkaz přítomnosti infekčního agens v pacientově organismu.

Mezi nejčastěji používané metody přímého průkazu DNA patogenů všeobecně patří amplifikace vybrané části genomu pomocí PCR (2,18).

2.2.1. Izolace nukleových kyselin ze vzorku

Pro detekci patogenů pomocí polymerázové řetězové reakce, ale i dalších technik, je nutno nejprve izolovat DNA infekčního agens z klinického vzorku. Nukleová kyselina patogenu se může nacházet extracelulárně, intracelulárně nebo integrovaná do buněčného genomu hostitele. Ve zpracovaných vzorcích není v čisté formě, ale společně s nadbytkem buněčné nukleové kyseliny, proteinů, solí, lipidů a jiných chemických sloučenin. Pro detekci a další analýzu je nutno ji alespoň částečně obnažit nebo dokonce oddělit od kontaminujících složek. Pro běžné diagnostické metody není naštěstí třeba nukleovou kyselinu patogenu oddělovat od další DNA. Oddělují se pouze ostatní složky (18).

Pro izolaci DNA i RNA se používají různé postupy izolací. V současné době se velmi často používají komerčně vyráběné soupravy (kity). Orientačně můžeme izolační postupy rozdělit na metody využívající fenol a metody bez-fenolové.

Principy izolací DNA vycházejí z chemických vlastností deoxyribonukleové kyseliny:

Fosfátové estery jsou silné kyseliny a chovají se jako anionty při neutrálním pH

- báze jsou jen slabě bazické a bez náboje
- DNA se snadno precipituje alkoholem
- vodíkové vazby mezi skupinami $-\text{NH}_2$ a $-\text{OH}$ jsou stabilní v rozmezí pH 4-9
- DNA je mimořádně stabilní molekula a zaujímá obvykle konformace A, B, C, Z

2.2.2. Amplifkační metody

2.2.2.1. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce byla zavedena roku 1983 Kery Mullisem. Je to in vitro metoda pro enzymatickou syntézu definované sekvence DNA.

Reakce využívá dvou oligonukleotidových primerů, které hybridizují s protichůdnými vlákny denaturované DNA a od jejich 3'- konců je zahájena syntéza komplementárních řetězců. Syntéza nové DNA je zprostředkována DNA polymerázou, v reakčním prostředí jsou přítomny deoxynukleotidy, které představují stavební kameny pro nově syntetizovanou DNA (20).

Reakce začíná denurací, tedy zvýšením teploty obvykle na 94 - 96°C po dobu 2 – 5 minut, kdy dojde k oddělení komplementárních řetězců dvouvláknové DNA. Důležitá je kompletní denaturace templátu, protože v případě, kdy dojde pouze k částečné denaturaci, molekuly DNA velice rychle renaturují a to vede k nescifické vazbě primerů a možným falešným výsledkům.

Následuje vlastní polymerázová řetězová reakce tvořená opakovanými reakčními cykly. Každý cyklus se skládá ze tří kroků, které jsou charakterizovány odlišnými teplotními požadavky (viz. obrázek č. 7).

První denaturační krok, 20 - 40 sekund se zahřívá na teplotu 94 - 95°C pro oddělení řetězců.

Druhým krokem je tzv. annealing, vazba primerů na obě komplementární vlákna DNA. Teplota se pohybuje v rozmezí 50 - 65°C, optimalizuje se

v teplotním gradientu nebo se stanovuje empiricky. Tato fáze obvykle trvá 30 - 60 sekund.

Posledním krokem je extenze (elongace) primerů, kdy dochází k syntéze nového komplementárního řetězce pomocí *Taq* DNA polymerázy a všech čtyř deoxyribonukleosidtrifosfátů ve směru 5'→3' na obou řetězcích. Při standardní PCR probíhá reakce při 72°C, po dobu 30 - 60 sekund. *Taq* DNA polymeráza syntetizuje při této teplotě DNA rychlostí přibližně 60bází/s. Nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus. Ten je opět zahájen denaturací, kdy dojde k oddělení nasyntetizovaných řetězců DNA. Během několika cyklů začnou v roztoku převažovat amplifikované molekuly o určité velikosti ohraničené z obou stran primery.

Obvykle se pro amplifikaci využívá 20 - 40 cyklů, přičemž se v každém cyklu množství molekul oproti předcházejícímu zdvojnásobí. Z celé molekuly DNA, která se použije do reakce je amplifikován pouze úsek mezi dodanými primery, protože DNA polymeráza pro iniciaci replikace na jiném místě primery chybí. Délka amplifikovaného úseku DNA je dána vzájemnou polohou primerů a bývá několik desítek až tisíc bazí, běžně se amplifikují úseky 100 - 300 bp (párů bazí).

Závěrečná extenze se provádí po posledním cyklu při teplotě 72°C/ 5 - 20 minut a slouží k dokončení syntézy a renaturaci jednořetězových produktů (20, 21).

Standardní PCR se nejčastěji provádí v reakční směsi o objemu 20 - 100μl a skládá se obvykle z pufru, hořčičných iontů, dNTPs (deoxynukleosidtrifosfáty), *Taq* DNA polymerázy a templátové nukleové kyseliny.

Templátem může být DNA nebo RNA. V případě amplifikace RNA, je nutné RNA před vlastní amplifikací reverzně transkribovat do jednovláknové cDNA, ke které je druhé komplementární vlákno přidáno amplifikující DNA polymerázou. Výchozí množství DNA je velmi nízké, obvykle postačuje méně než 1μg genomové DNA, teoreticky postačuje jedna molekula. Množství templátové nukleové kyseliny volíme podle její velikosti, kvalita templátu ovlivňuje výsledek PCR. Doporučovaná množství DNA podle velikosti templátu jsou: 100 - 500ng lidské genomové DNA, 1 - 10 ng bakteriální DNA a 0,1 - 1 ng plazmidové DNA (18, 22).

Primery jsou syntetické oligonukleotidy o velikosti 10 - 30 nukleotidů. Sekvence a koncentrace ovlivňuje výsledek PCR. Optimální koncentrace je mezi 0,1 - 0,6 μM . U některých systémů může vyšší koncentrace zlepšit výsledky. Naopak nižší koncentrace vede k předčasnému vyčerpání primerů a snížení výtěžku. Poměr GC : AT by měl být 1 : 1, primery by měli obsahovat oblasti bohaté na AT a GC a neměly by být mezi sebou komplementární.

V PCR občas dochází k tvorbě tzv. dimer primeru, reakčního produktu složenému primárně z primerů použitých v reakci, který je dlouhý asi jako dvojnásobek délky jednotlivých primerů. Je velmi účinně amplifikován a může se stát převládajícím produktem, čímž může snížit účinnost amplifikace specifických sekvencí. Jinak jeho přítomnost neinterferuje s detekcí specifických sekvencí.

Deoxynukleosidtrifosfáty se používají buď ve formě Na^+ nebo Li^+ solí. Výsledná koncentrace se pohybuje v rozmezí 50 -100 μM pro každý nukleotid. Nejběžnější používaná koncentrace je 200 μM . Při zvýšení koncentrace dNTP je třeba zvýšit koncentraci Mg^+ iontů.

Hořečnaté ionty tvoří rozpustný komplex s dNTP a tvoří substrát, který rozpoznává DNA polymeráza. Volné hořečnaté ionty ovlivňují aktivitu enzymu. Pro dosažení nejoptimálnějšího výsledku se jejich koncentrace stanovuje experimentálně. Optimální koncentrace může kolísat od 1 mM do 5 mM. Nejčastěji používaná koncentrace je 1,5 mM (pro 200 μM dNTP).

Termostabilní *Taq* DNA polymeráza pochází z termofilního mikroorganismu *Thermus aquaticus* žijícího v horkých pramenech. Její teplotní optimum je 75 - 80°C. Enzym však vydrží teploty nad 90°C, dokonce až 98°C. Díky tomu lze enzym dodat pouze na začátku a reakci zautomatizovat použitím termálního cykléru. Obvyklá koncentrace je 0,5 - 2,5 jednotek/50 μl , ale v jednotlivých případech je vhodné vyzkoušet širší škálu koncentrací. Příliš nízká koncentrace polymerázy je příčinou nedostatečné tvorby produktu, příliš vysoká způsobuje nespecifitu. Porfyriny, heparin, methanol a detergenty inhibují její aktivitu. Termostabilní DNA polymerázy byly izolovány i z dalších mikroorganismů, např. *Tth* DNA polymeráza z *Thermus thermophilus* nebo *Pwo* DNA polymeráza z *Pyrococcus woesei*.

Hodnota pH je dána reakčním pufrům. Obvykle odpovídá pH 8,3 - 9,0. Obsahuje 10 - 50 mmol/l Tris-HCl, maximálně 50 mmol/l KCl, případně další

látky, které mohou v některých případech ovlivnit účinnost a specifčnost PCR reakce. Jejich vliv se obvykle určuje experimentálně. Mohou to být např. albumin bovinního séra (100 ng/50 μ l), dimethylsulfoxid (2 - 10% v/v - redukuje nespecifické vazby primeru), detergenty (Tween 20), betain (0,5 - 2 M), želatina, glycerol (19,21).

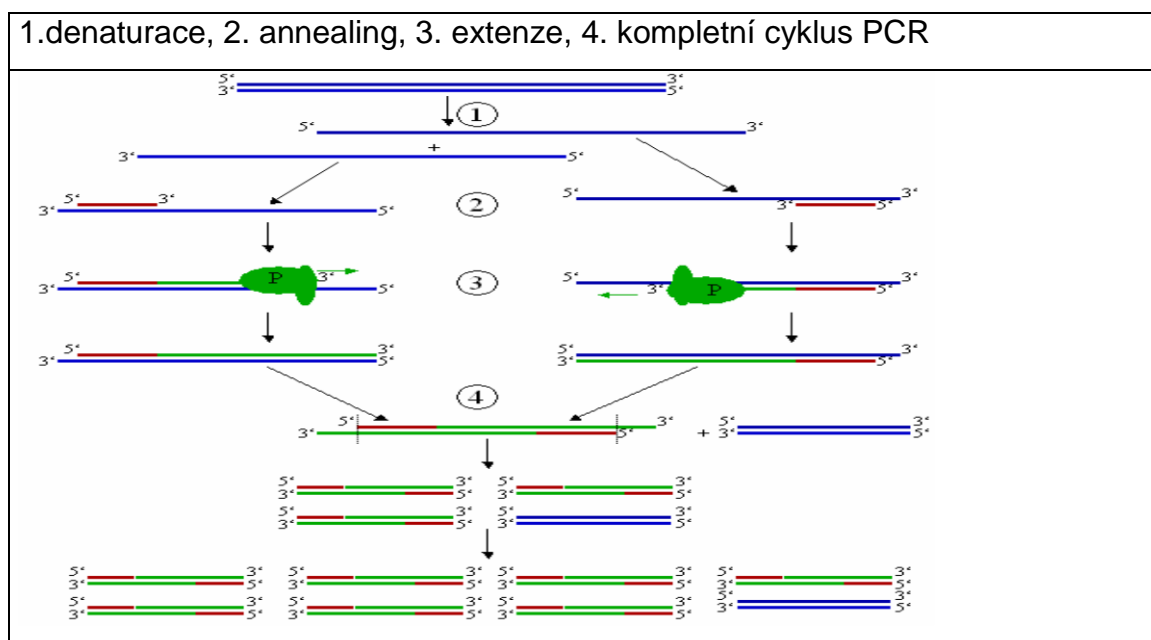
Dříve se také používal minerální olej, kterým se opatrně převrstvovala reakční směs a zabraňoval tak vypařování během reakce. Dnes už se díky technologiím termálních cyklérů s vyhříványými víky nepoužívá.

Aplikace molekulárně genetických metod na bázi PCR reakcí v diagnostice infekčních onemocnění je založena na identifikaci unikátních, tzv. signálních či specifických sekvencí v molekulách nukleových kyselin patogenních mikroorganismů. Detekce charakteristických fragmentů nukleových kyselin patogenních mikroorganismů ve vyšetřovaných vzorcích klinického materiálu je ve většině případů pokládána za důkaz právě probíhajícího nebo nedávno proběhlého infekčního onemocnění (23).

V rutinní diagnostice je účelné amplifikovat více úseků DNA najednou. Při této tzv. multiplex reakci je použito více párů specifických primerů. Dochází k amplifikaci více cílových sekvencí při jedné reakci. Tohoto je možno využít např. při testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA nebo pro současnou amplifikaci vnitřní kontroly společně se vzorky. Výhodou jsou i nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích (24).

PCR technika proniká do všech oblastí molekulární biologie. Díky PCR není již limitován výzkum dříve „nedostupné“ DNA jak v oblasti molekulárně biologického výzkumu, tak v diagnostice. Použití a možnosti PCR se rozšířily do všech oblastí i díky nejrůznějším modifikacím jako jsou např. nested PCR, zpětná tzv. RT-PCR, *in situ* PCR, obrácená tzv. inverse PCR, asymetrická PCR a další (20).

Obr.č.7. *Princip PCR (25)*



2.2.3. Gelová elektroforéza

DNA fragmenty vzniklé PCR reakcí nebo štěpením restrikcními endonukleázami jsou běžně analyzovány pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. Nukleové kyseliny migrují v agarózovém gelu vlivem působení stejnoměrného elektrického pole a rychlost této migrace je nepřímo úměrná dekadickému logaritmu počtu párů bazí. Větší fragmenty se tedy pohybují pomaleji, menší rychleji. Při neutrálním pH je DNA negativně nabitá a migruje od katody směrem k anodě. Příčinou rovnoměrného rozložení negativních nábojů v molekulách DNA a RNA je sacharido-fosfátová páteř nukleových kyselin (21).

Elektroforéza se provádí v horizontální poloze submerzní formou. K jejímu provedení se používají elektroforetické vany a hřebeny různých rozměrů. Agarózové gely bývají 3 - 6 mm silné, pomocí hřebene se tvoří jamky pro nanášení produktu PCR. Produkt je před nanesením do jamky smíchan s nanášecím roztokem (loading buffer), který je těžký, viskózní a umožňuje vložení vzorku do jamky v gelu pod puřem. Nanášecí roztok obsahuje také barvy (např. bromfenolovou modř) řídící délku dělení; lze sledovat, v jaké části

gelu se fragmenty nacházejí. Elektroforéza probíhá při pokojové teplotě, nejčastěji používané napětí je 100 V.

Pro vizualizaci DNA fragmentů se z fluorescenčních látek používá nejčastěji ethidium bromid, který vytváří komplex s DNA. Tento komplex absorbuje UV světlo o vlnové délce 260 - 300 nm. Pro zvýšení citlivosti detekce DNA produktu lze použít SybreGreen. Tato fluorescenční látka je asi 8-10x citlivější než ethidium bromid.

Rozlišovací schopnost agarózových gelů závisí zejména na koncentraci agarózy a dále na použitém pufru. Koncentrace gelu musí být volena v závislosti na velikosti separovaných DNA fragmentů.

Tab.č.1. *Separační rozmezí agarózových gelů*

Agaróza (%)	DNA (bp)
1%	800 bp a více
1,5%	600 – 800 bp
2%	200 – 800 bp
3%	80 – 200 bp

Kratší fragmenty je nutné dělit v polyakrylamidovém gelu nebo pomocí speciální agarózy (např. MetaPhore Agarose). Polyakrylamidový gel je druhým nejčastěji používaným elektroforetickým médiem v molekulární biologii. Může být denaturační, obvykle s ureou nebo nedenaturační. Jedná se o vertikální elektroforézu (18, 24).

2.2.4. Kontrola kvality

Pro zajištění správnosti výsledků je v laboratoři prováděna pravidelná vnitřní kontrola kvality. V molekulárně biologických metodách se skládá z pozitivní kontroly, negativní kontroly a inhibiční kontroly. Externí hodnocení kvality se používá pro porovnání vlastních výsledků s jinými laboratořemi.

2.2.4.1. Pozitivní kontrola amplifikace

Pozitivní kontrola amplifikace umožní kontrolovat řádný průběh amplifikační reakce, musí být řazena ke každému běhu PCR. Pro tento účel se

používá vyizolovaná DNA (resp. RNA) z kultury příslušného mikroorganismu nebo z pozitivního biologického materiálu. Pozitivní kontrola nezaručuje správnost izolace (26).

2.2.4.2. Negativní kontrola amplifikace

Negativní kontrola musí být opět řazena ke každému běhu PCR, v případě většího počtu vzorků je vhodné použít dvě až tři negativní kontroly. Nejčastěji se používá voda, je možné využít izolaci z negativního biologického materiálu. Přidává se k amplifikační směsi ve stejném množství jako templátová DNA. Její význam spočívá v kontrole toho, zda nedošlo ke kontaminaci templátu či amplifikační směsi PCR produktem (26).

2.2.4.3. Inhibiční kontrola amplifikace

Ve vyšetřovaném materiálu se může vyskytovat řada látek způsobujících inhibici polymerázové řetězové reakce. Přítomnost nejrůznějších inhibitorů rekombinantní termostabilní *Taq* DNA polymerázy může vést k falešně negativním výsledkům. K nejčastěji se vyskytujícím inhibitorům patří hemoglobin, bilirubin, heparin, guanidin, dextran sulfát sodný, triglyceridy, glukóza. Literatura (26) uvádí výskyt inhibitorů u 2 - 25 % vzorků v závislosti na typu odebraného materiálu. Je vhodné používat interní standardy jako indikátory procesu. Amplifikace interního standardu probíhá v jedné reakční zkumavce s testovanou DNA. Pokud nedojde k amplifikaci interní kontroly (IC), lze předpokládat inhibici PCR. Použití interní kontroly amplifikace vyloučí vydávání falešně negativních výsledků při průkazu extrahumánního genomu v klinickém materiálu.

Amplifikace vnitřních standardů může být provedena různými způsoby. Buď může být do reakční směsi (MasterMixu) přidán kromě páru primerů komplementárních k vyšetřovanému cíli další pár primerů komplementárních pro vnitřní standard a reakce je pak prováděna jako multiplex PCR. Při vyšetření klinického materiálu, který obsahuje dostatek lidských buněk, se využívá přítomnost lidské DNA a probíhá amplifikace například genu β -aktin, β -globin, β -mikroglobulin, tzv. housekeepingových genů. U materiálu, který obsahuje minimum či neobsahuje žádnou lidskou DNA, se do amplifikační směsi přidává cizorodá DNA. Nebo se může používat PCR směs obsahující

pouze jeden pár primerů komplementárních pro diagnostický cíl i pro speciálně připravenou vnitřní kontrolu. Použití shodných primerů umožňují identické 5' - koncové sekvence vnitřního standardu s cílovým úsekem vyšetřovaného agens. Tato reakce je založena na principu koamplifikace nukleových kyselin ve vzorku a tudíž dochází ke kompetici o vložené primery.

Při kvalitativním průkazu vyšetřovaného agens musí být koncentrace IC velmi nízká, na hranici citlivosti, aby nemohlo dojít k amplifikaci IC na úkor nukleové kyseliny infekčního agens, a to ani při jejím velmi nízkém množství ve vzorku (26).

Problémem diagnostické aplikace PCR technik je také riziko kontaminace a možná falešná pozitivita zapříčiněná vlastní vysokou citlivostí těchto technik. Nejčastějšími zdroji kontaminace jsou poměrně velká množství cílových molekul DNA nebo RNA přítomných ve vyšetřovaných vzorcích, popř. kontaminace reagensů používaných pro PCR reakce, které již byly několikrát použity. Nejčastěji je to však akumulace produktů PCR reakcí v laboratoři při opakovaných amplifikacích týchž cílových sekvencí. K zamezení přenosu je nutné všechny reagenty používané v reakci fyzicky izolovat od zařízení a nástrojů, jimiž se analyzují produkty, nejlépe v oddělené laboratoři, používat pipetovací špičky s filtrem atd. Dodržování ochranných mechanismů je nedílnou součástí vnitřní kontroly kvality.

Jedním ze způsobů jak zabránit kontaminaci reakční směsi produkty předchozích reakcí je metoda, kdy je v procesu amplifikace deoxythymidintrifosfát (dTTP) substituován deoxyuridintrifosfátem (dUTP). Produkty PCR z předchozí reakce jsou eliminovány excizí uracilových zbytků působením uracil-N-glykosylázy. Během krátké inkubace před vlastní amplifikací, jsou řetězce DNA obsahující uracil, které jsou přítomny v reakční směsi ještě z předcházejícího klonování, enzymaticky degradovány. Tyto "roztrhané", nežádoucí řetězce se pak nemohou stát substrátem pro další amplifikaci. Samotná uracil-N-glykosyláza je pak teplotně inaktivována při 95°C, takže nové produkty PCR se již mohou akumulovat v reakční směsi. Získá se tedy nekontaminovaná reakční směs, která se amplifikuje běžnou metodou (18).

2.2.5. Technologie real-time PCR

K provádění real-time PCR se používají modifikované termocykléry, tzv. světelné cykléry pro real-time PCR, např. LightCycler (LC). Technologie LightCycler patří mezi nejnovější inovace v oblasti PCR. Umožňuje provádět PCR v reálném čase (tzv. real-time PCR), někdy také označovanou jako kinetická PCR. Jedná se o rychlou, vysoce citlivou a specifickou metodu, která umožňuje průběžné sledování tvorby PCR produktů již během jednotlivých amplifikačních cyklů. Nachází široké uplatnění při kvantifikaci DNA (RNA) ve zkoumaných vzorcích a také při určování teploty tání PCR produktů (T_m). T_m je důležitou charakteristikou nově vytvořených amplikonů. Poskytuje informace využitelné např. pro identifikaci PCR produktů, odlišení nežádoucích (nespecifických) produktů (např. primer - dimerů) nebo pro detekci mutací (22). Při kvantitativní real-time PCR lze průběh amplifikace průběžně kontrolovat a porovnání s příslušným standardem lze provést v optimálním bodě amplifikace. Má široký dynamický rozsah stanovení koncentrace v rozsahu několika řádů, zvyšuje přesnost, redukuje chyby a podmínky PCR lze poměrně rychle optimalizovat. Díky tomu, že vše probíhá v uzavřeném systému, nehrozí zde riziko kontaminace PCR produktem, a tím, že neprobíhá žádné post - PCR zpracování vzorku, je zkrácen i čas nutný pro získání výsledku (17, 22).

Poznatky, které položily základ kinetické PCR byly získány v letech 1991 - 1992, kdy Higuchi a spol. vytvořili systém, s jehož pomocí bylo možné zaznamenat produkty PCR bezprostředně po jejich vzniku, tedy po každém jednotlivém cyklu PCR. Využili při tom dobře známé vlastnosti interkalačního barviva ethidium bromidu (Et-Br), které po ozáření UV světlem fluoreskuje. Toho lze využít při fixaci Et-Br na nově vytvořené dvouřetězcové DNA a měřit zvyšující se intenzitu fluorescenčního záření během PCR.

Dnes existuje několik metod pro on-line fluorimetrickou detekci a vyhodnocení PCR. (interakční barviva – SYBR Green I, hybridizační FRET sondy, hydrolytické TaqMan sondy, Molecular Beacons, LightUp sondy).

2.2.5.1. SYBR Green

SYBR Green I je interkalační barvivo, které se váže na menší úseky dvoušroubovice DNA. K maximální excitaci *SYBR Green I* dochází při 497 nm.

Maximum emise DNA obarvené tímto barvivem je při 521 nm. *SYBR Green I* je velmi stabilní při teplotách i pH, které se vyskytují při rychlém tepelném cyklování (ztrácí pouze 6% aktivity během 30 amplifikačních cyklů). Sám o sobě ale ve velmi vysokých koncentracích začíná inhibovat PCR reakci.

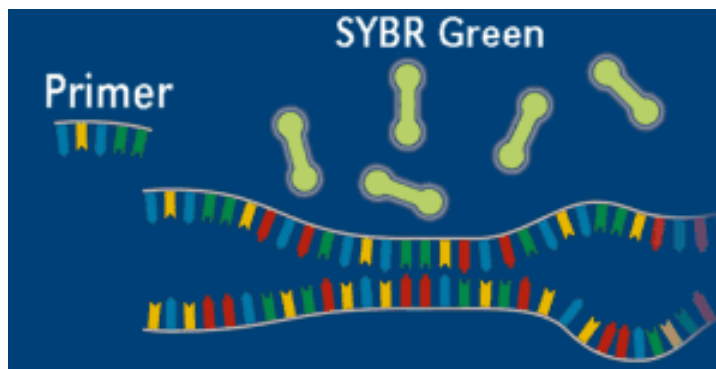
Princip reakce:

Na počátku amplifikace obsahuje reakční směs denaturovanou jednořetězcovou DNA, primery, *SYBR Green I* a další komponenty jako hořčnaté ionty a *Taq* polymerázu. V této fázi není barvivo navázáno na DNA a intenzita fluorescence je na nízké úrovni. Během annealingu PCR hybridizují primery k cílové sekvenci za vzniku malého množství dvouřetězcové DNA, na kterou se může navázat *SYBR Green I*, čímž vzroste intenzita fluorescence. V elongační fázi PCR se primery komplementárně prodlužují a tudíž se může vázat stále více barviva. Na konci elongační fáze jsou všechny DNA dvoušroubovicemi a je navázáno maximální množství barviva. Fluorescence (emise zeleného záření) se zaznamenává až na konci elongační fáze (extenze) při 530 nm. Narůstající množství PCR produktu se měří v každém cyklu. Intenzita fluorescenčního signálu je úměrná celkovému množství dsDNA přítomné v reakci.

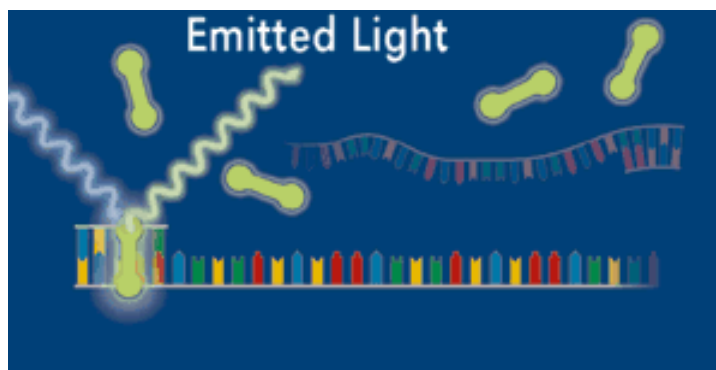
Výhodou této metody je jednoduchost provedení, citlivost a při použití *SYBR Green I* není potřeba dělat desing a optimalizaci sond.

Nevýhodou této metody je, že signál může být detekován, i když v reakci není žádná specifická cílová sekvence. Tento signál vzniká z důvodu vazby barviva na dvoušroubovici vedlejšího produktu, neboť *SYBR Green I* se váže stejnoměrně na jakoukoliv dvoušroubovici DNA; na specifické i nespecifické produkty nebo i primery - dimery. Vznik primer - dimerů je výsledkem použití neúplně optimálních primerů a objevuje se obzvláště v reakci, kde je málo templátu nebo vůbec žádná DNA (27, 28, 29)

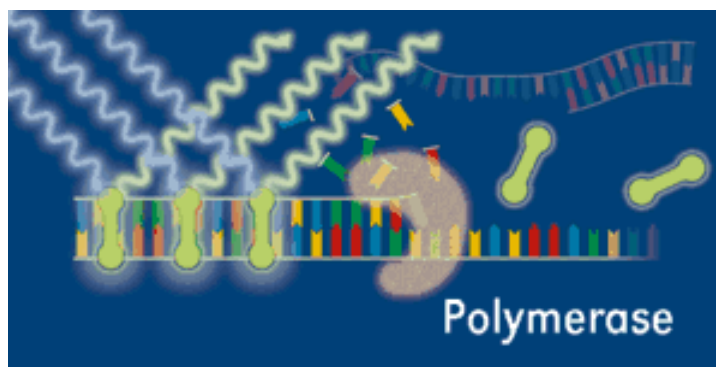
Obr.č.8. *Princip reakce barviva SYBR Green I*



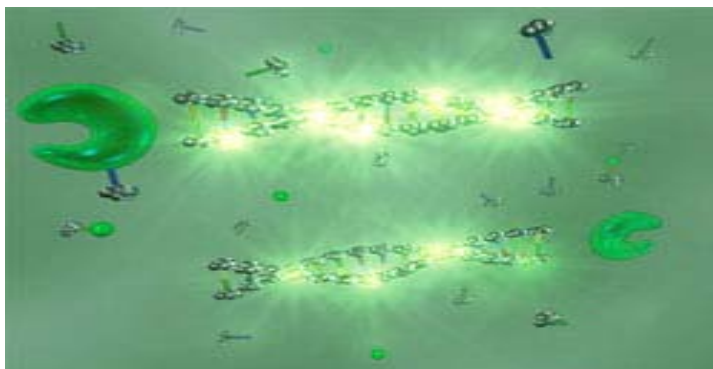
DENATURACE



ANNEALING



EXTENZE



FLUORESCENCE

2.2.5.2. Hybridizační FRET sondy

Pro sekvenčně specifickou detekci PCR produktu se využívají hybridizační sondy (próby), které umožňují detekci DNA a její kvantifikaci. V současných systémech se využívají dvě specificky navržené, sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy značené dvěma různými barvami. Sekvence těchto prób se volí tak, aby mohly komplementárně hybridizovat na cílovou sekvenci amplifikovaného DNA fragmentu v „head-to-tail” uspořádání (polymerace „hlava-pata”), čímž se váží dvě barvy v těsné blízkosti. Mezi barvy, tzv. fluorofory, které jsou k těmto účelům používány, patří fluorescein, *LightCycler Red 640 (LC Red 640)* a *LightCycler Red 705 (LC Red 705)*.

Princip reakce:

Základem reakce jsou dvě hybridizační sondy označené rozdílnými fluorescenčními barvami. První sonda je označena na 3' -konci fluoresceinem a plní funkci donorového fluoroforu, druhá sonda je označena na 5' -konci buď *LC Red 640* nebo *LC Red 705* a slouží jako akceptorová barva. Reakční směs obsahuje kromě dvou sond ještě reakční pufr, dNTPs, *Taq* polymerázu, protilátku proti polymeráze, hořčičnaté kationty, primery a templát. Během denaturace vytváří templát jednořetězová vlákna.

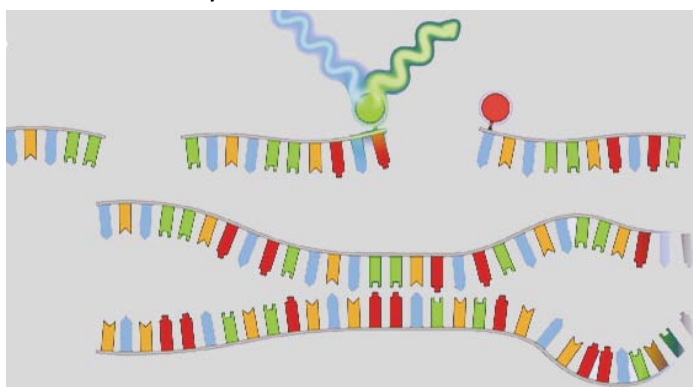
Druhá hybridizační sonda (*LC Red 640*, resp. *LC Red 705*) se nijak neuplatňuje, ale první sonda (fluorescein) se excituje modrým světlem (470nm) a emituje zelené světlo o delší vlnové délce (530nm). Detekce fluorescence však probíhá při 640 nm, resp. 705 nm a proto je v této fázi fluorescenční signál nulový. Po dosažení annealingové teploty hybridizují PCR primery a sondy komplementárně ke svým specifickým sekvencím cílových úseků. Donorová

barva se tak dostává do těsné blízkosti k akceptorovému fluoroforu. Fluorescein se excituje modrým světlem (470nm) ze zdrojové LED diody a následně emituje zelené fluorescenční světlo o trochu delší vlnové délce (530 nm). Když jsou dvě barvy navázané v těsné blízkosti, předává emitované světlo část své energie pomocí dipól - dipólových interakcí akceptorové barvě (navázané na druhou hybridizační próbu). Ta poté emituje fluorescenční světlo o odlišné vlnové délce. Tento energetický přenos se označuje jako fluorescenčně rezonanční přenos energie (FRET). Světlo emitované LC Red 640, resp. 705 se následně měří na konci každého annealingu, tedy v době, kdy dosahuje fluorescence svého maxima. S každou nově vytvořenou molekulou amplikonu se zvyšuje intenzita fluorescence. Cyklus, ve kterém dojde k nárustu fluorescence na detekovatelnou úroveň, je nepřímo úměrný koncentraci cílové DNA, tzn. čím větší je množství DNA, tím menší počet cyklů je zapotřebí k počátečnímu vzrůstu fluorescence (27, 28, 30, 31).

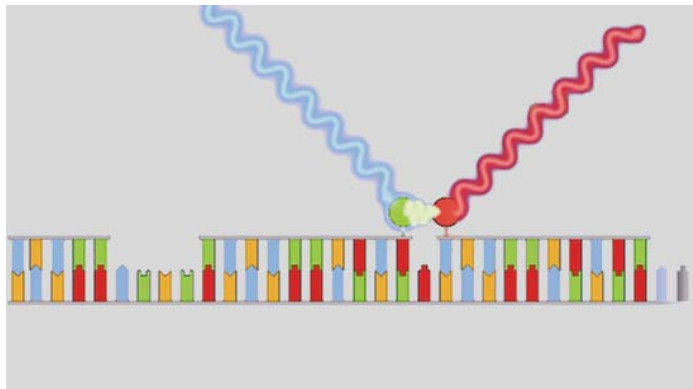
V dalším kroku (elongaci) dochází k vzestupu teploty, což má za následek oddělení sond od cílových sekvencí. Během elongace také *Taq* polymeráza dosyntetizovává dceřinné vlákno komplementárně k templátovému vláknu. Na konci tohoto kroku jsou produkty PCR dvoušroubovicemi a sondy jsou příliš daleko od sebe, a proto nemůže docházet k FRET.

Výhodou této metody je, že při použití hybridizačních sond se nedetekuje fluorescence, pokud není ve vzorku přítomen cílový templát. Ačkoliv ve směsi může docházet k tvorbě primer – dimerů, nebudou tyto detekovány, neboť se využívá sekvenčně specifického detekčního formátu.

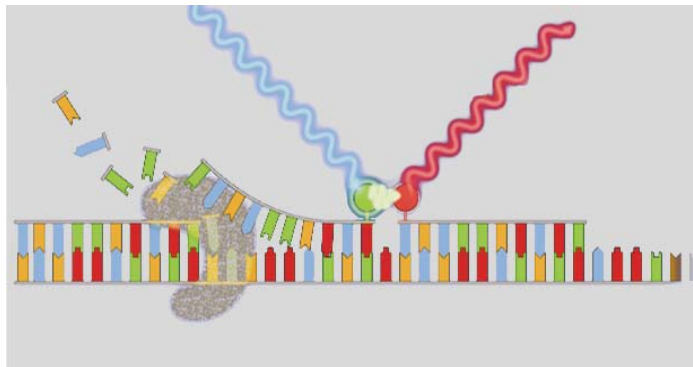
Obr.č.9. Princip fluorescenčního záření – FRET sonda



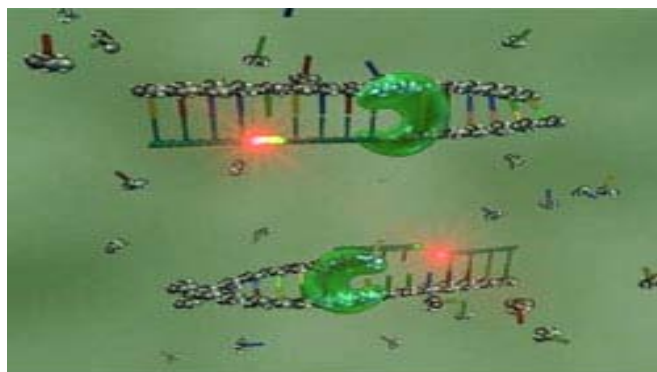
DENATURECE



ANNEALING



EXTENZE



FLUORESCENCE

2.2.5.3. Hydrolytické sondy (*TaqMan sondy, duálně značené sondy*)

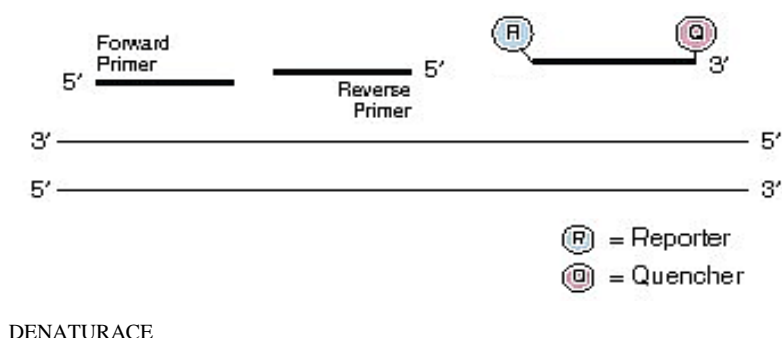
TaqMan technika využívá jedné sondy, většinou o dvaceti až třiceti nukleotidech, která je značená na obou koncích. První fluorofor na 5' -konci sondy plní funkci zářiče (reportér) a druhý na 3' -konci má funkci zhášedce (quencher).

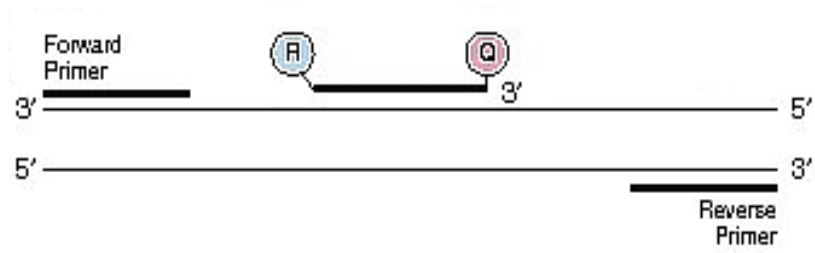
Princip reakce:

U sondy v inaktivním (výchozím) stavu zhášec potlačuje záření emitované blízkým zářičem a to procesem FRET. V reasociační fázi PCR (annealing) dojde k hybridizaci sondy na cílovou sekvenci DNA mezi oba primery. Záření je zatím ještě potlačeno zhášecem. V průběhu elongace při vytváření nového řetězce postupující *Taq* polymeráza svojí 5'→3' exonukleázovou aktivitou nejdříve rozruší komplex sondy s cílovou sekvencí DNA. Poté dojde k exonukleázovému rozštěpení TaqMan sondy a oddálení zhášec. Tím se zářič vymaní z tlumivého vlivu zhášec a emituje fluorescenci. Ta je měřena na konci každé elongační fáze PCR. S každou nově vytvořenou molekulou amplikonu se zvyšuje intenzita fluorescence. Cyklus, ve kterém dojde k nárustu fluorescence na detekovatelnou úroveň, je nazýván Ct (threshold cyklus) a je nepřímo úměrný koncentraci cílové DNA. Čím větší je množství DNA, tím menší počet cyklů je zapotřebí k dosažení Ct. V závislosti na počtu cyklů, případně z kalibrační křivky paralelně amplifikovaného vnitřního standardu, je pak možno stanovit koncentraci neznámého vzorku.

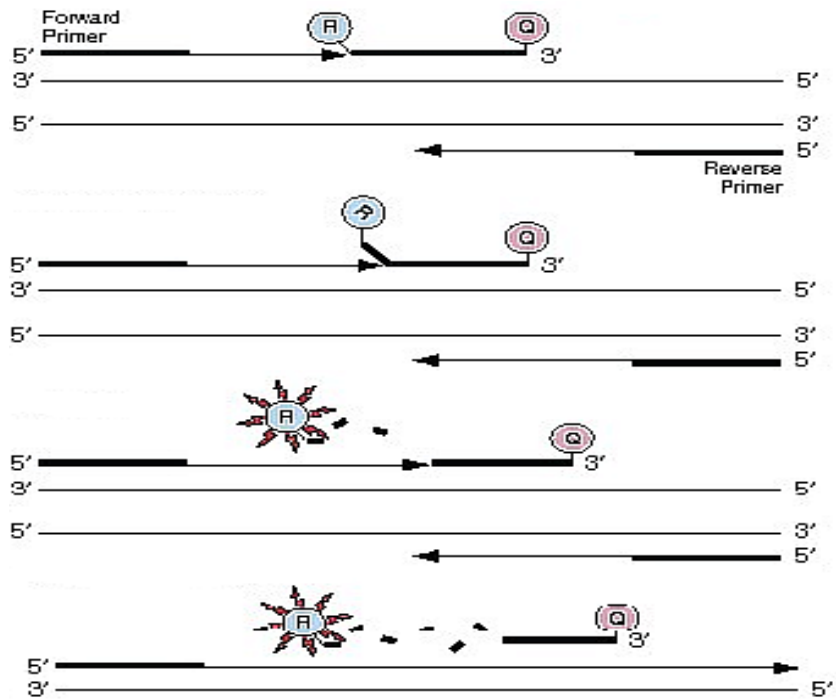
Jako zářiče se nejčastěji používají FAM (6-karboxyfluorescein) nebo JOE (2', 7'-dimetoxy-4', 5'-dichloro-6-karboxyfluorescein). Funkci zhášec zastává TAMRA (6-karboxytetramethylrhodamin) nebo BHQ (Black Hole Quencher) (27, 28, 30).

Obr.č.10. *Princip fluorescenčního záření – TaqMan sondy*

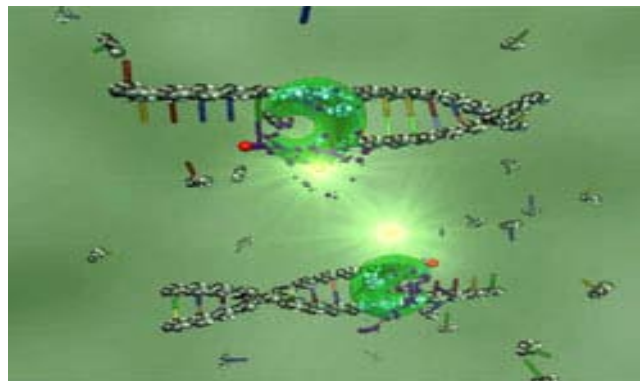




ANNEALING



EXTENZE



FLUORESCENCE

2.2.5.4. Molekulové signály (*Molecular beacons*)

Pro kvantifikaci DNA se využívají vysoce specifické sondy (*Molecular beacons* - vyvinuté Fredem R. Kramerem), které mají tvar vlásenky, jejichž střed (15 až 30 nukleotidů) je komplementární k cílové sekvenci. Okrajové úseky (4 až 6 nukleotidů) sondy jsou komplementární navzájem. Na jednom konci sondy je připojen zářič (reportér) a na druhém konci (quencher), jejichž těsná blízkost u volné sondy způsobí zhášení přirozené fluorescenční emise reportéru (27,30,32).

Princip reakce:

Během annealingu real - time PCR se sonda excituje světlem z přístroje (LED diody). *Molecular beacons* sonda hybridizuje ke své cílové sekvenci jednořetězcové DNA, což způsobí otevření smyčky vlásenky a oddálení reportéru na 5 '-konci a zhášeče na 3' -konci. Protože zhášeč již není v těsné blízkosti, aby mohl dostatečně absorbovat emisi reportérové barvy není potlačena fluorescence a přístroj detekuje signifikantní nárůst emitované energie. K měření fluorescence proto dochází na konci annealingu. Změřený signál je přímo úměrný množství cílové DNA (27,30, 32).

2.2.6. Real–time PCR cyklery

LightCycler (Roche Diagnostics)

LightCycler je unikátní kombinací rychlého teplotního cyklátoru pro polymerázovou řetězovou reakci a mikrofluorimetru, která umožňuje flexibilní *on – line*, real-time detekci reakční kinetiky (viz. obrázek č. 8). Důležitým rysem tohoto přístroje je skutečnost, že k amplifikaci a analýze dochází ve stejném reakčním prostoru. LightCycler je možné použít pro rychlou kvantitativní analýzu vstupního počtu molekul templátu pomocí PCR a analýzu hybridizačních křivek, použitelnou pro identifikace/charakterizace PCR produktů nebo pro mutační analýzu (30).

Pro typické ohřívání a ochlazování vzorků při PCR se používá vzduch, který má velmi malou teplotní kapacitu. Vlastní (RT) PCR reakce probíhá ve speciálních skleněných kapilárách s vysokým poměrem objem/povrch.

Spojením obou faktorů je možné měnit velmi rychle teplotu reakční směsi (až 20°C/sec). LightCycler je jedním z nejrychlejších teplotních cyklátorů – 30 cyklů PCR je možné provést (v závislosti na dané reakci) za méně než 20 minut. Skleněná kapilára působí jako optický prvek podobný skleněnému vláknu – záření aplikované na špičku kapiláry je rozvedeno po celém objemu kapiláry a uvnitř kapiláry excitované fluorescenční záření je možné měřit ve špičce. Běžný reakční objem je 20 µl.

Kapiláry jsou umístěné v karuselu s 32 pozicemi, který může být vyjmut a naplněn vzorky mimo přístroj. To také znamená, že je možné karusel snadno čistit a dezinfikovat (30).

Fluorimetr používá jako zdroj světla LED diodu s dlouhou životností a bez nároků na údržbu (29). Excitační světlo se filtruje na příslušnou vlnovou délku a zaměří soustavou čoček na špičku kapiláry. Emitované záření vzorku je zkoncentrované stejnou soustavou čoček a po průchodu přes systém zrcadel a filtrů změřené. Použité filtry umožňují měřit fluorescenci při třech vlnových délkách – 530, 640 a 710 nm. Tyto vlnové délky byly navrženy tak, aby docházelo k co nejmenšímu spektrálnímu ovlivňování při použití tří fluorescenčních barev v jedné reakci (přesah je dále eliminován pomocí tzv. kompenzačních souborů). Používají se pro měření fluorescence fluoresceinu a SYBR Green I (530 nm) a fluorescenčních barev LightCycler Red 640 a 705. Protože se fluorescein standardně používá jako donorové fluorescenční barvivo, může se provádět multiplex PCR se dvěma různými templáty nebo zjišťovat různé mutace.

LightCycler se dodává s počítačem a příslušným ovládacím software. Během jednotlivých cyklů je PCR reakce monitorována měřením fluorescence a neměřené výsledky jsou okamžitě (po každém měření) zobrazovány na monitoru. Signál je měřen vždy po přesném nastavení vzájemné pozice dané kapiláry proti optické jednotce. Doba měření je asi 20 msec a všech 32 vzorků se proměří za asi 5 vteřin. Získaná data se použijí při následné analýze (kvantifikaci, detekci mutací). V případě potřeby se do daného PCR profilu může přidat krok, kterým se provede analýza hybridizačních křivek.

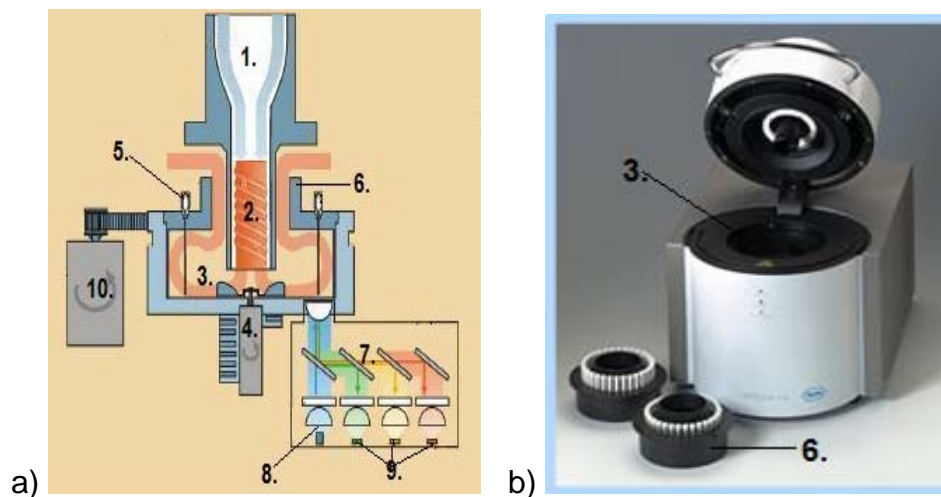
Při použití LightCycleru se sleduje zvyšování koncentrace cílové DNA měřením fluorescence. Používají se dva odlišné přístupy. Při obou se do

reakční směsi před vlastní amplifikací přidají jak jednotlivé komponenty pro PCR (nukleotidy, enzym, primery, templát), tak fluorescenční barvivo.

Principiálně je možné využít LightCycler pro dva odlišné typy kvantifikací. Jednak pro absolutní kvantifikaci, kdy se stanovuje množství vstupního templátu reakci v absolutních hodnotách porovnáním se standardy (pomocí kalibrační křivky) a pro relativní kvantifikaci, kdy se koncentrace vstupního templátu vyjádří jako poměrná hodnota vztahením k obsahu vhodného *house – keeping* genu (27).

Obr.č.11. *Light cycler* a) schématický náčrt, b) fotka

1. přívod vzduchu, 2. tepelná spirála, 3. tepelná komora, 4. ventilátor, 5. kapilára, 6. karusel, 7. Fluorimetr, 8. LED dioda, 9. detekční kanály, 10. rotor pohybující karuselem (55).



3. EXPEDIMENTÁLNÍ ČÁST, VÝSLEDKY

3.1. IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA

Vhodným materiálem pro diagnostiku bakteriálních meningitid je likvor, eventuelně sérum.

Extrakci bakteriální DNA všech vzorků jsme prováděli z likvoru komerčním kitem QIAamp DNA Mini Kit firmy QIAGEN (Hilden, Německo). Proces extrakce je zahájen počáteční lýzou proteinů v prostředí lyzačního pufru za přítomnosti proteinázy K. Následným přidáním ethanolu dochází k precipitaci bakteriální DNA a k jejímu zachycení na koloně. Precipitovaná DNA se poté promývá wash-pufrem, čímž se odstraní bílkoviny a jiné nečistoty. Jelikož tento pufr obsahuje ethanol, nedochází k rozpuštění DNA a nukleová kyselina zůstává zachycena na koloně. K jejímu rozpuštění a vymytí z kolony dochází až po eluci vhodným roztokem zahřátým na laboratorní teplotu.

Postupovali jsme podle protokolu izolace bakteriální a virové DNA komerčním kitem QIAamp DNA Mini Kit (250) firmy QIAGEN. Bakteriální DNA byla námi upraveným postupem izolována (pokud bylo dostatečné množství likvoru) ze dvou alikvotů - 200 µl homogenního vzorku likvoru a 200 µl sedimentu po předchozí centrifugaci 8000 ot/10 min následujícím postupem:

- vzorky bylo nutno ekvilibrovat na laboratorní teplotu (15 - 25⁰C)
- do plastové centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml jsme napipetovali 20 µl QIAGEN proteinázy K.
- připipetovali jsme 200 µl vzorku (Při nedostatku vzorku je nutno doplnit do 200 µl pufrem PBS).
- připipetovali jsme 200 µl AL a 15 sekund intenzivně třepali
- inkubace 10 min při 56⁰C v předehřátém termobloku
- krátce jsme centrifugovali (centrifugace probíhá při laboratorní teplotě)
- připipetovali jsme 200 µl 96% ethanolu. Intenzivně jsme třepali v pulzech 15 sekund a poté jsme vzorek krátce centrifugovali.
- vzniklou směs jsme přepipetovali na kolonu se sběrnou tubou, centrifugovali jsme 1 minutu při 8 000 rpm. Kolonu jsme poté umístili na novou sběrnou tubu.

- připipetovali jsme 500 μ l AW1, centrifugovali 1 minutu při 8 000 rpm. Kolonu jsme opět přemístili na novou sběrnou tubu a použitou sběrnou tubu jsme odstranili.
- připipetovali jsme 500 μ l AW2, centrifugovali jsme 3 minuty při 14 000 rpm.
- kolonu jsme umístili na plastovou mikrozkušavku o objemu 1,5 ml. Připipetovali jsme 200 μ l AE pufru nebo sterilní vody (předeřáté na laboratorní teplotu) a nechali inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Poté jsme centrifugovali 1 minutu při 8 000 rpm.
- po dobu 48 – 72 hodin je možno vyizolovanou DNA skladovat při teplotě 4°C. Pro dlouhodobé skladování vzorků je třeba uchovávat DNA při –20°C (33)

3.2. AMPLIFIKACE VYIZOLOVANÉ DNA

K provedení jednotlivých PCR reakcí pro průkaz bakteriální DNA jednotlivých původců bakteriálních meningitid jsme použili amplifikační návody z oddělení molekulární biologie ÚKBD, které byly postupně v letech 1999 – 2001 optimalizovány.

3.2.1. Průkaz DNA *Neisseria meningitidis* metoda standardní PCR

K provedení standardní PCR jsme využili primery z oblasti genu *crg* (A1 5'- GCT GGC GCC GCT GGC AAC AAA ATTC-3') a (A2 5'- CTT CTG CAG ATT GCG GCG TGC CGT-3') (34). Složení MM je uvedeno v tabulce č.2. Tab. č.2. *Obsah směsi pro PCR (MM) pro průkaz DNA Neisseria meningitidis*

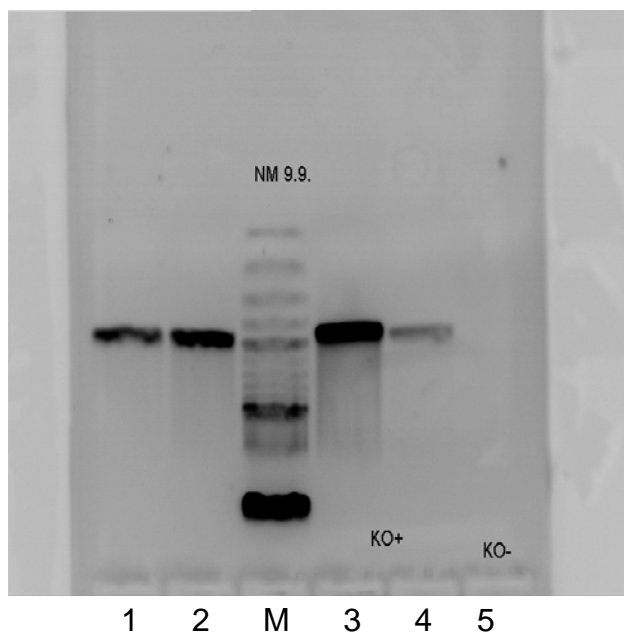
22 μ l směsi + 3 μ l templátové DNA		1 vzorek
voda		12,8 μ l
pufr <i>Invitrogen</i> (10 \times konc.)	1 \times	2,5 μ l
dNTPs (2,5 mmol/l)	0,2 mmol/l	2,0 μ l
Mg ²⁺ (25 mmol/l)	2,5 mmol/l	2,5 μ l
primer <i>crg</i> A1 (10 pmol/ μ l)	0,4 μ mol/l	1,0 μ l
primer <i>crg</i> A2 (10 pmol/ μ l)	0,4 μ mol/l	1,0 μ l
<i>Taq</i> polymeráza <i>Invitrogen</i> (5 U/ μ l)	1,0 U	0,2 μ l

Pro amplifikaci jsme využili cyklér RoboCycler Gradient bez vyhřívání víka. Z tohoto důvodu bylo nutné zakapat MM v PCR zkumavkách olejem. PCR probíhala za tohoto teplotního profilu:

- iniciační denaturace 5 min při 95°C
- dále 35 cyklů:
- 30 s denaturace 95°C
 - 30 s annealing při 55°C
 - 30 s elongace při 72°C
 - závěrečná extenze 10 min při 72°C

Amplifikační produkty očekávané velikosti 230 bp jsme detekovali elektroforeticky na 2% agarózovém gelu po obarvení ethidium bromidem. Použili jsme velikostní marker M XIII firmy Roche Diagnostics (po 50 bp). Pro příklad uvádíme: na obrázku č.12. je detekována pozitivita průkazu DNA *Neisseria meningitidis*

Obr. č.12. *Elektroforetická detekce průkazu DNA Neisseria meningitidis*



Vysvětlivky k obrázku č.12.

1. vzorek CSF pozitivní pro DNA *Neisseria meningitidis*
2. vzorek CSF pozitivní pro DNA *Neisseria meningitidis*

M velikostní marker po 50 bp (Roche, M XIII)

3. pozitivní kontrola
4. pozitivní kontrola
5. negativní kontrola

3.2.2. Průkaz DNA *Streptococcus pneumoniae* metoda standardní PCR

K provedení standardní PCR, jsme použili primery z oblasti genu 16S rRNA (SP 5'-AAG GTG CAC TTG CAT CAC TAC -3') a (UR 5'- CTA CGC ATT TCA CCG CTA CAC -3') (35) . Složení MM je uvedeno v tabulce č.3.

Tab.č.3. *Obsah směsi pro PCR (MM) pro průkaz DNA Streptococcus pneumoniae*

20 µl směsi + 5 µl templátové DNA		1 vzorek
voda		10,25 µl
pufr <i>Invitrogen</i> (10× konc.)	1×	2,5 µl
dNTPs (2,5 mmol/l)	0,2 mmol/l	2,0 µl
Mg ²⁺ (25 mmol/l)	1,5 mmol/l	1,5 µl
primer UR (10 pmol/µl)	0,8 µmol/l	2,0 µl
primer SP (10 pmol/µl)	0,5 µmol/l	1,25 µl
Taq polymeráza <i>Invitrogen</i> (5 U/µl)	1,0 U	0,2 µl

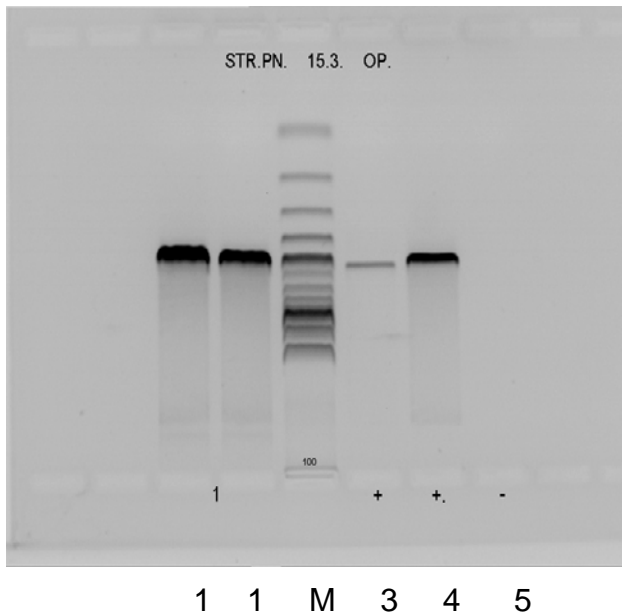
Pro amplifikaci jsme využili cyklér M. J. Research DYAD. PCR probíhala za tohoto teplotního profilu:

- iniciační denaturace 3 min při 94°C
- dále 38 cyklů:
- 30 s denaturace 94°C
 - 40 s annealing při 66°C
 - 40 s elongace při 72°C
 - závěrečná extenze 7 min při 72°C

Amplifikační produkty očekávané velikosti 484 bp jsme detekovali elektroforeticky na 2% agarózovém gelu po obarvení ethidium bromidem.

Použili jsme velikostní marker M XIII firmy Roche Diagnostics (po 50 bp). Pro příklad uvádíme: na obrázku č.13. je detekována pozitivita průkazu DNA *Streptococcus pneumoniae*

Obr.č.13. *Elektroforetická detekce průkazu DNA Streptococcus pneumoniae*



Vysvětlivky k obrázku č.13.

1. vzorek CSF pozitivní pro DNA *Streptococcus pneumoniae*
2. vzorek CSF pozitivní pro DNA *Streptococcus pneumoniae*
- M velikostní marker po 50 bp (Roche, M XIII)
3. pozitivní kontrola
4. pozitivní kontrola
5. negativní kontrola

3.2.3. Průkaz DNA *Haemophilus influenzae* metoda standardní PCR

K provedení standardní PCR, jsme použili primery z oblasti genu 16S rRNA (HI 5'- CGT ATT ATC GGA AGA TGA AAG TGC - 3') a (UR 5'- CTA CGC ATT TCA CCG CTA CAC -3') (35). Složení MM je uvedeno v tabulce č.4.

Tab.č.4. Obsah směsi pro PCR (MM) pro průkaz DNA *Haemophilus influenzae*

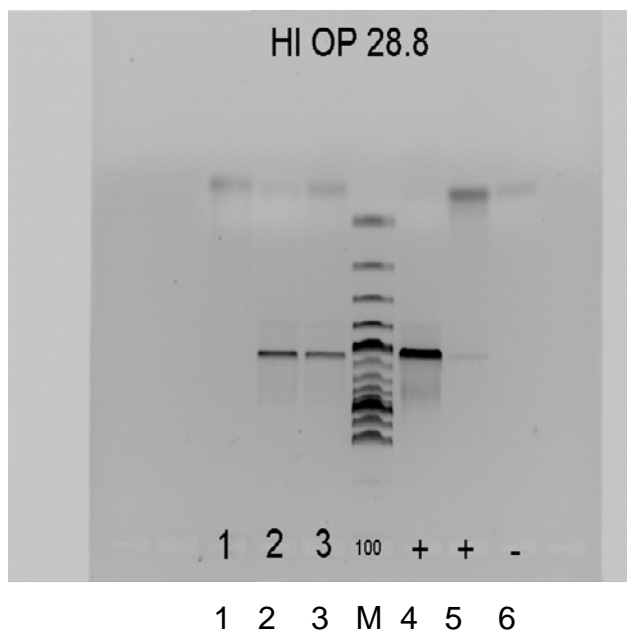
20 µl směsi + 5 µl templátové DNA		1 vzorek
voda		10,25 µl
pufr <i>Invitrogen</i> (10× konc.)	1×	2,5 µl
dNTPs (2,5 mmol/l)	0,2 mmol/l	2,0 µl
Mg ²⁺ (25 mmol/l)	1,5 mmol/l	1,5 µl
primer UR (10 pmol/µl)	0,8 µmol/l	2,0 µl
primer HI (10 pmol/µl)	0,5 µmol/l	1,25 µl
Taq polymeráza <i>Invitrogen</i> (5 U/µl)	1,0 U	0,2 µl

Pro amplifikaci jsme využili cyklér M. J. Research DYAD. PCR probíhala za tohoto teplotního profilu:

- iniciační denaturace 3 min při 94°C
- dále 38 cyklů:
- 30 s denaturace 94°C
 - 40 s annealing při 66°C
 - 40 s elongace při 72°C
 - závěrečná extenze 7 min při 72°C

Amplifikační produkty očekávané velikosti 525 bp jsme detekovali elektroforeticky na 2% agarózovém gelu po obarvení ethidium bromidem. Použili jsme velikostní marker M XIII firmy Roche Diagnostics (po 50 bp). Pro příklad uvádíme: na obrázku č.14. je detekována pozitivita průkazu DNA *Haemophilus influenzae*

Obr.č.14. *Elektroforetická detekce průkazu DNA Haemophilus influenzae*



Vysvětlivky k obrázku č.14.

1. negativní kontrola
2. vzorek CSF pozitivní pro DNA *Haemophilus influenzae*
3. vzorek CSF pozitivní pro DNA *Haemophilus influenzae*
- M velikostní marker po 50 bp (Roche, M XIII)
4. pozitivní kontrola
5. pozitivní kontrola
6. negativní kontrola

3.2.4. Průkaz DNA *Staphylococcus aureus* metoda standardní PCR

K provedení standardní PCR jsme použili primery z oblasti genu fem B (femB – rv 5'-TGC GCA ACA CC CTG AAC TT-3') a (femB – fw 5'-AAT TAA CGA AAT GGG CAG AAA CA-3') (36). Složení MM je uvedeno v tabulce č.5.

Tab.č.5. Obsah směsi pro PCR (MM) pro průkaz DNA *Staphylococcus aureus*

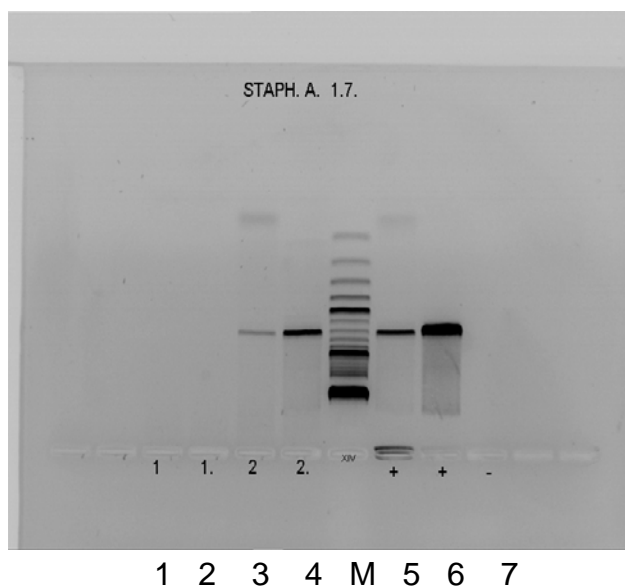
1. PCR		
20 µl směsi + 5 µl templátové DNA		1 vzorek
voda		12,9 µl
pufr <i>TaKaRa</i> (10× konc.)	1×	2,5 µl
dNTPs (2,5 mmol/l)	0,2 mmol/l	2,0 µl
primer fem – 1 (10 pmol/µl)	0,48 µmol/l	1,2 µl
primer fem – 2 (10 pmol/µl)	0,48 µmol/l	1,2 µl
HS Taq polymeráza <i>TaKaRa</i> (5 U/µl)	1,0 U	0,2 µl

Pro amplifikaci jsme využili cyklér M. J. Research DYAD. PCR probíhala za tohoto teplotního profilu:

- iniciační denaturace 10 min při 95⁰C
- dále 40 cyklů:
- 40 s denaturace 94⁰C
 - 50 s annealing při 56⁰C
 - 1 min elongace při 72⁰C
 - závěrečná extenze 7 min při 72⁰C

Amplifikační produkty očekávané velikosti 686 bp jsme detekovali elektroforeticky na 2% agarózovém gelu po obarvení ethidium bromidem. Použili jsme velikostní marker M XIII firmy Roche Diagnostics (po 50 bp). Pro příklad uvádíme: na obrázku č.15. je detekována pozitivita průkazu DNA *Staphylococcus aureus* v hemokultuře.

Obr.č.15. *Elektroforetická detekce průkazu DNA Staphylococcus aureus – hemokultura*

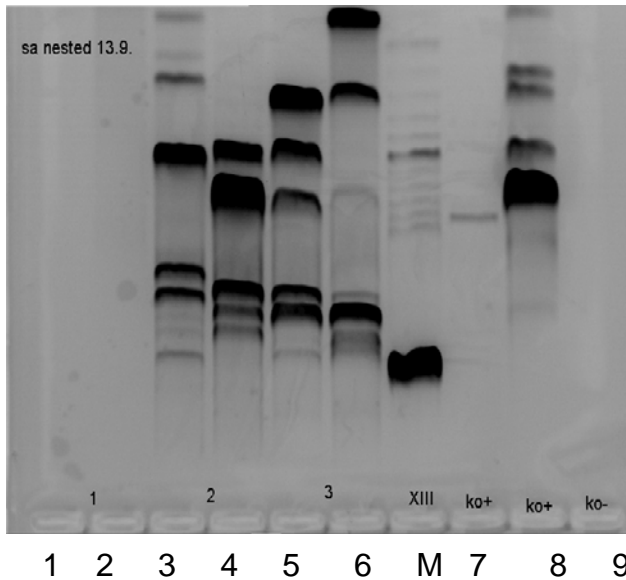


Vysvětlivky k obrázku č.15.

1. vzorek CSF negativní pro DNA *Staphylococcus aureus*
2. vzorek CSF negativní pro DNA *Staphylococcus aureus*
3. vzorek hemokultura pozitivní pro DNA *Staphylococcus aureus*
4. vzorek hemokultura pozitivní pro DNA *Staphylococcus aureus*
- M velikostní marker po 50 bp (Roche, M XIII)
5. pozitivní kontrola
6. pozitivní kontrola
5. negativní kontrola

Na obrázku č.16. je elektroforetická detekce DNA *Staphylococcus aureus* v biologickém materiálu s výraznými nespecifickými bandy.

Obr.č.16. *Elektroforetická detekce průkazu DNA Staphylococcus aureus - biologický materiál*



Vysvětlivky k obrázku č.16.

1. vzorek CSF negativní pro DNA *Staphylococcus aureus*
2. vzorek CSF negativní pro DNA *Staphylococcus aureus*
3. vzorek CSF sl.pozitivní pro DNA *Staphylococcus aureus*
4. vzorek CSF pozitivní pro DNA *Staphylococcus aureus*
5. vzorek moče pozitivní pro DNA *Staphylococcus aureus*
6. vzorek moče pozitivní pro DNA *Staphylococcus aureus*
- M velikostní marker po 50 bp (Roche, M XIII)
7. pozitivní kontrola
8. pozitivní kontrola
9. negativní kontrola

3.2.5. Průkaz DNA *Escherichia coli* metoda standardní PCR

K provedení standardní PCR, jsme použili primery z oblasti genu *E.coli* inner (Eco3 5'-TAT GAA CTG TGC GTC ACA GCC -3') a (Eco4 5'-CAT CAG CAC GTT ATC GAA TCC -3') (37). Složení MM je uvedeno v tabulce č.6.

Tab.č.6. *Obsah směsi pro PCR (MM) pro průkaz DNA Escherichia coli*

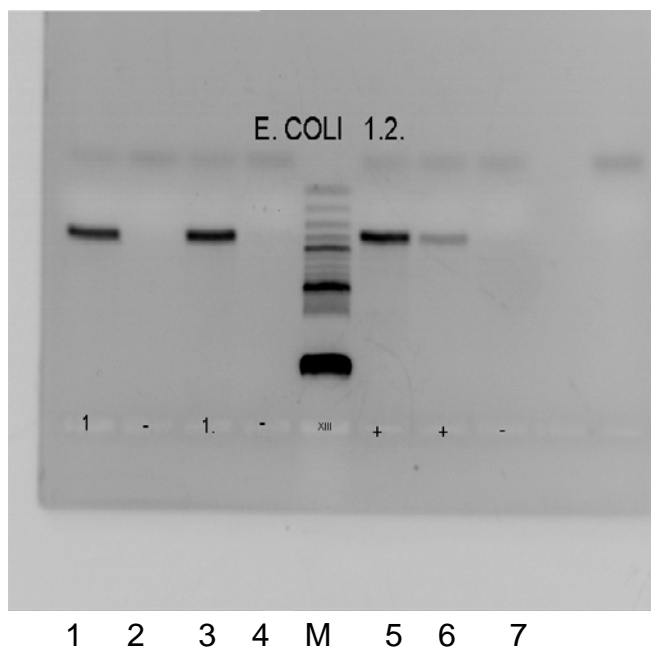
20 μ l směsi + 5 μ l templátové DNA		1 vzorek
voda		13,3 μ l
pufr <i>TaKaRa</i> (10 \times konc.)	1 \times	2,5 μ l
dNTPs (2,5 mmol/l)	0,2 mmol/l	2,0 μ l
primer Eco – 3 (10 pmol/ μ l)	0,4 μ mol/l	1,0 μ l
primer Eco – 4 (10 pmol/ μ l)	0,4 μ mol/l	1,0 μ l
HS Taq polymeráza <i>TaKaRa</i> (5 U/ μ l)	(5 U/ μ l)	0,2 μ l

Pro amplifikaci jsme využili cyklér M. J. Research DYAD. PCR probíhala za tohoto teplotního profilu:

- iniciační denaturace 10 min při 94 $^{\circ}$ C
- dále 35 cyklů:
- 30 s denaturace 94 $^{\circ}$ C
 - 30 s annealing při 60 $^{\circ}$ C
 - 30 s elongace při 72 $^{\circ}$ C
 - závěrečná extenze 10 min při 72 $^{\circ}$ C

Amplifikační produkty očekávané velikosti 186 bp jsme detekovali elektroforeticky na 3% agarózovém gelu po obarvení ethidium bromidem. Použili jsme velikostní marker M XIII firmy Roche Diagnostics (po 50 bp). Pro příklad uvádíme: na obrázku č.17. je detekována pozitivita průkazu DNA *Escherichia coli*.

Obr.č.17. Elektroforetická detekce průkazu DNA *Escherichia coli*



Vysvětlivky k obrázku č.17.

1. vzorek CSF pozitivní pro DNA *Escherichia coli*
2. negativní kontrola
3. vzorek CSF pozitivní pro DNA *Escherichia coli*
4. negativní kontrola
- M velikostní marker po 50 bp (Roche, M XIII)
5. pozitivní kontrola
6. pozitivní kontrola
7. negativní kontrola

3.2.6. Průkaz DNA *Listeria monocytogenes* metoda nested PCR

K provedení nested PCR, jsme použili primery z oblasti genu pro 1. PCR iap outer(LM1 5'- CAA AGG TGG ATC CAA AGT AAC TGT-3') a (LM2 5'-TGG AGC TTC CGA ATT CAC TTC TG-3') (38). Složení MM je uvedeno v tabulce č.7.

Tab.č.7. Obsah směsi pro 1.PCR (MM) pro průkaz DNA *Listeria monocytogenes*

1. PCR		
20 µl směsi + 5 µl templátové DNA		1 vzorek
voda		12,3 µl
pufr <i>Invitrogen</i> (10× konc.)	1×	2,5 µl
dNTPs (2,5 mmol/l)	0,2 mmol/l	2,0 µl
Mg ²⁺ (25 mmol/l)	2,0 mmol/l	2,0 µl
primer LIS A (10 pmol/µl)	0,2 µmol/l	0,5 µl
primer LIS B (10 pmol/µl)	0,2 µmol/l	0,5 µl
Taq polymeráza <i>Invitrogen</i> (5 U/µl)	1,0 U	0,2 µl

Pro amplifikaci jsme využili cyklér M. J. Research DYAD. PCR probíhala za tohoto teplotního profilu:

- 5 min 25⁰C
 - iniciační denaturace 5 min při 95⁰C
- dále 37 cyklů:
- 40 s denaturace 95⁰C
 - 45 s annealing při 50⁰C
 - 50 s elongace při 72⁰C
 - závěrečná extenze 10 min při 72⁰C

Velikost produktu po 1.PCR 468 bp byl použit do 2.PCR, primery z oblasti genu iap inner (LM3 5'- CGA ATC TAA CGG CTG GCA CA-3') a (LM4 5'- GCC CAA ATA GTG TCA CCG CT-3') (38). Složení MM je uvedeno v tabulce č.8.

Tab.č.8. *Obsah směsi pro 2.PCR (MM) pro průkaz DNA Listeria monocytogenes*

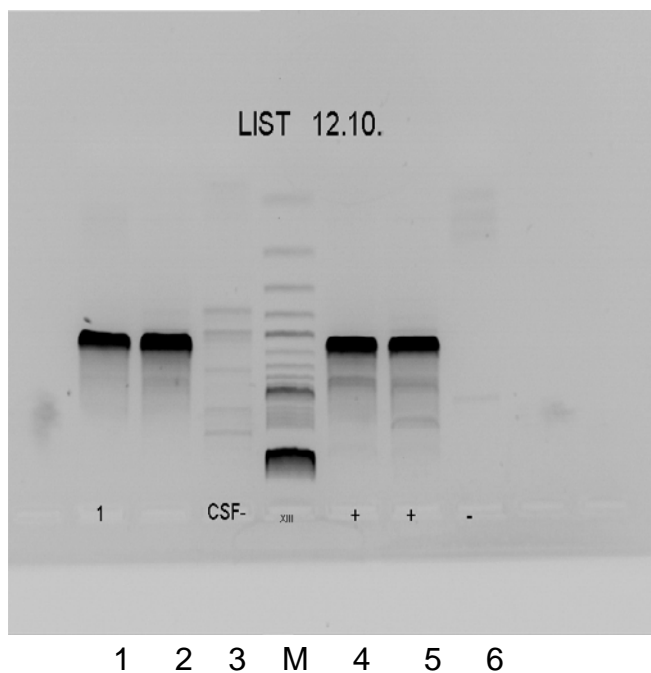
2. PCR		
20 µl směsi + 5 µl produktu 1. PCR		1 vzorek
voda		11,3 µl
pufr <i>Invitrogen</i> (10× konc.)	1×	2,5 µl
dNTPs (2,5 mmol/l)	0,2 mmol/l	2,0 µl
Mg ²⁺ (25 mmol/l)	2,0 mmol/l	2,0 µl
primer LIS C (10 pmol/µl)	0,4 µmol/l	1,0 µl
primer LIS D (10 pmol/µl)	0,4 µmol/l	1,0 µl
Taq polymeráza <i>Invitrogen</i> (5 U/µl)	1,0 U	0,2 µl

Pro amplifikaci jsme využili cyklér M. J. Research DYAD. PCR probíhala za tohoto teplotního profilu:

- iniciační denaturace 5 min při 95⁰C
- dále 28 cyklů:
 - 40 s denaturace 95⁰C
 - 45 s annealing při 50⁰C
 - 50 s elongace při 72⁰C
 - závěrečná extenze 10 min při 72⁰C

Amplifikační produkty očekávané velikosti 287 bp jsme detekovali elektroforeticky na 2% agarózovém gelu po obarvení ethidium bromidem. Použili jsme velikostní marker M XIII firmy Roche Diagnostics (po 50 bp). Pro příklad uvádíme: na obrázku č.18. je detekována pozitivita průkazu DNA *Listeria monocytogenes*.

Obr.č.18. *Elektroforetická detekce průkazu DNA Listeria monocytogenes (detekce po 2. PCR)- nested PCR*



Vysvětlivky k obrázku č.18.

1. vzorek CSF pozitivní pro DNA *Listeria monocytogenes*
2. vzorek CSF pozitivní pro DNA *Listeria monocytogenes*
3. vzorek CSF negativní pro DNA *Listeria monocytogenes*
- M velikostní marker po 50 bp (Roche, M XIII)
4. pozitivní kontrola
5. pozitivní kontrola
6. negativní kontrola

3.3. OPTIMALIZACE REAL-TIME PCR PRO PRŮKAZ DNA *Staphylococcus aureus*

Pro průkaz DNA *Staphylococcus aureus* jsme použili jako cílovou sekvenci specifický *fem B* gen (39). Tento gen je považován za specifický genomický marker pro *Staphylococcus aureus*. Primery a hydrolytickou TaqMan sondu nám dle našich požadavků navrhla firma Generi Biotech (Česká Republika).

V tabulce č.9. jsou uvedeny oligonukleotidové primery a TaqMan sonda použité v real-time PCR .

Tabulka č.9. Oligonukleotidové primery a TaqMan sonda pro real-time PCR

gen	Primery/sonda	sekvence	Umístění na genu	Vel produktu(bp)
fem B	fem B- fw	5 -AATTAACGAAATGGGCAGAAACA	277-299	93
	femB- rv	5 -TGCGCAACACCCTGAACTT	370-351	
	sonda	FAM- AGAAATTA ACTGGATGGTACGCGGAAGA	301-330	

Jedná se o sondu FAM/BHQ1, typ quencheru je představován nefluorescenčním barvivem BHQ1 – FAM. Sondu v lyofilizované formě jsme rozpustili přidáním 50 μ l destilované vody na koncentraci 10 pmol/ μ l (0,01mM), rozpipetovali daný objem do alikvotů a zmrazili při -20°C. Při této teplotě se také uchovávají. Sondy je třeba chránit před světlem.

Také primery byly dodávány v lyofilizovaném stavu. Primery jsme rozpustili ve vodě na koncentraci 100 pmol/ μ l (0,1 mM roztok) a naředili na pracovní koncentraci 10 pmol/ μ l (0,01 mM), se kterou jsme pracovali při optimalizaci vlastní real-time PCR. Velikost fragmentu DNA, který se amplifikuje při použití těchto primerů, je 93 bp.

Autoři publikace Klotz M., Opper S., Heeg K., Zimmermann S. „*Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR*“ použili následující koncentrace jednotlivých položek: 6 mM MgCl₂, 50 pmol primerů (tj 0,2 umol/l) a 150 nM (0,15 umol/l) TaqMan sondy, 15 ul MM a 10 ul templátové DNA, k real-time PCR použili termocyklér ABI PRISM 7700

s teplotním profilem 50⁰ C 2 min, 95⁰ C 10 min, 45 cyklů 95⁰C 15 s a 60⁰C 1 min.

Optimalizovali jsme metodu použitou v práci Klotz M., Opper S., Heeg K., Zimmermann S. „*Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR*“ na přístroji LightCycler 2.0 a pro podmínky naší laboratoře. Při optimalizaci real-time PCR pro průkaz DNA *S.aurea* jsme použili následující složky amplifikační směsi: Light Cyler FastStart DNA Master Hybridization Probe (Roche Diagnostics), který obsahuje: FastStart *Taq* DNA polymerázu (*Taq* DNA polymerázu s protilátkou umožňující hot start), reakční pufr, mix dNTPs (obsahující dUTP místo dTTP). Pro zabránění kontaminace reakční směsi produkty předchozích reakcí jsme použili systém s uracil – N – glykosylázou.

Důležitým faktorem pro správný průběh PCR je koncentrace Mg²⁺ iontů. Pro dosažení optimální koncentrace jsme do reakční směsi přidávali odpovídající množství zásobního roztoku MgCl₂ 25 mmol/l. Složení reakční směsi pro průkaz SA metodou real-time PCR, vycházející z publikace (39) uvádíme v tabulce č.10.

Tab. č.10. Složení reakční směsi č. 1 pro real-time PCR SA

Hybridizační Light Cyler FastStart DNA MasterMix 10 x	1,25 µl
Mg ²⁺ (25 mmol/l) 6 mM	3 µl
Primer 1 Fw (10pmol/µl) 0,2uM	0,25 µl
Primer 2 Rv (10pmol/µl) 0,2 uM	0,25 µl
Sonda FAM/BHQ 0,150uM (10pmol/µl)	0,1875 µl
UNG (uracil – N – glykosyláza 1U/ µl)	0,1 µl
Voda ad 7,5 ul	5,4625 µl

Do reakce jsme použili 7,5µl mastermixové směsi a 5 ul templátové DNA. Zároveň jsme provedli real-time PCR s koncentracemi, které běžně pro obdobné reakce používáme v naší laboratoři, složení amplifikační směsi uvádíme v tabulce č.11.

Tab. č.11. Složení reakční směsi č. 2 pro real- time PCR SA

Hybridizační Light Cycler FastStart DNA MasterMix 10 x	1,25 µl
Mg ²⁺ (25 mmol/l) 3 mM	1,5 µl
Primer 1 Fw (10pmol/µl) 0,4 uM	0,5 µl
Primer 2 Rv (10pmol/µl) 0,4uM	0,5 µl
Sonda FAM/BHQ 0,2 uM (10pmol/µl)	0,25 ul
UNG (uracil – N – glykosyláza 1U/ µl)	0,1 µl
Voda ad 7,5 ul	4,9 µl

Teplotní profil PCR reakce pro obě výše uvedené amplifikační směsi uvádíme v tabulce č.12.

Tab. č.12. Teplotní profil PCR reakce

Inkubace UNG:	50°C	2 min
Úvodní denaturace:	95°C	10 min
50 cyklů real – time PCR: denaturace	95°C	15 sec
annealing	60°C	1 min

Fluorescence je kontinuálně měřena v každém cyklu na konci polymerace pomocí kanálu F2.

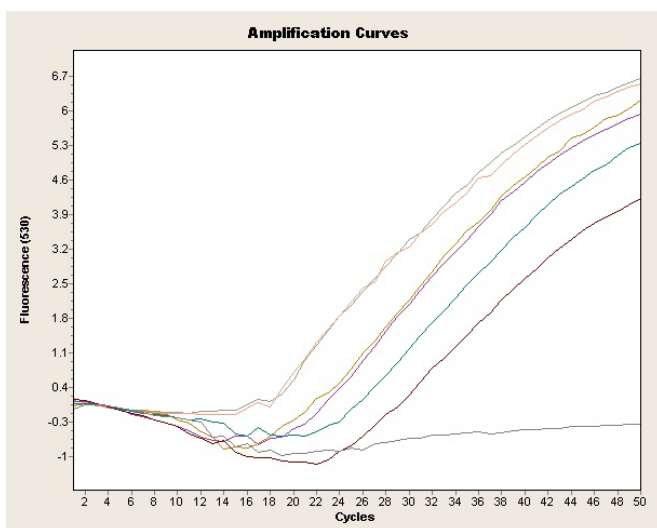
V tabulce č.13. jsou uvedeny naměřené CP hodnoty jednotlivých naředěných vzorků kmene SA získaných pomocí real-time PCR.

Tab. č.13. CP hodnoty naředěných vzorků kmene SA

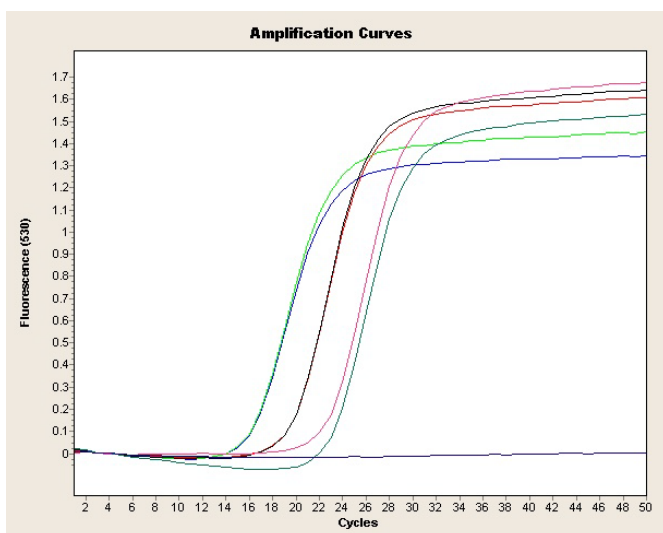
Pozice vzorku	označení vzorku	CP
MM č. 1		
1	Kmen SA	21,25
2	Kmen SA	21,00
3	10 x ředěno	26,65
4	10 x ředěno	26,00
5	100 x ředěno	29,70
6	100 x ředěno	32,29
7	voda	

MM č. 2		
8	Kmen SA	21,05
9	Kmen SA	21,00
10	10 x ředěno	23,86
11	10 x ředěno	23,83
12	100 x ředěno	26,92
13	100 x ředěno	26,81
14	voda	-

Obr. č.19. Amplifikační křivky jednotlivých vzorků získané pomocí real-time PCR (MM č.1)



Obr. č.20. Amplifikační křivky jednotlivých vzorků získané pomocí real-time PCR MM č. 2



Další úpravou reakčních podmínek při následujících měřeních jsme se pokoušeli zvýšit citlivost reakce. Zaměřili jsme se zvláště na koncentraci hořčíku a zkrácení časových profilů jednotlivých částí real-time PCR. Koncentraci primerů a sond jsme ponechali na běžně používaných koncentracích 0,4 uM pro primery a 0,2 uM pro sondu.

3.3.1. Optimalizace Mg²⁺ kationtů

Porovnali jsme další dvě koncentrace hořečnatých kationtů – 3mM a 4 mM Mg²⁺ a sledovali podle hodnot CP citlivost reakce. Složení obou amplifikačních směsí je uvedeno v tabulkách č.14. a 15. Zároveň jsme upravili objem celkového množství směsi na 10 ul, a to 7 ul MM a 3 ul templátové DNA.

Tab č.14. *Směs č.3. 3mM Mg²⁺kationtů*

Hybridizační Light Cycler FastStart DNA MasterMix 10 x	1,0 µl
Mg ²⁺ (25 mmol/l) 3 mM	1,2µl
Primer 1 Fw (10pmol/µl) 0,4 uM	0,4 µl
Primer 2 Rv (10pmol/µl) 0,4uM	0,4 µl
Sonda FAM/BHQ 0,2 uM (10pmol/µl)	0,2 ul
UNG (uracil – N – glykosyláza 1U/ µl)	0,1 µl
Voda ad 7,5 ul	3,7

Tab č.15. *Směs č. 4. 4mM Mg²⁺kationtů*

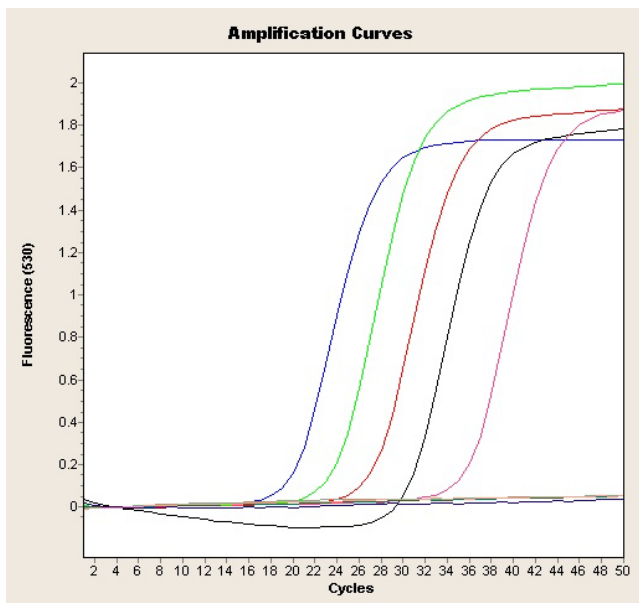
Hybridizační Light Cycler FastStart DNA MasterMix 10 x	1,0 µl
Mg ²⁺ (25 mmol/l) 3 mM	1,6µl
Primer 1 Fw (10pmol/µl) 0,4 uM	0,4 µl
Primer 2 Rv (10pmol/µl) 0,4uM	0,4 µl
Sonda FAM/BHQ 0,2 uM (10pmol/µl)	0,2 ul
UNG (uracil – N – glykosyláza 1U/ µl)	0,1 µl
Voda ad 7,5 ul	3,3 ul

Hodnoty naměřených hodnot jednotlivých naředěných vzorků (*kmen SA*) získaných pomocí real-time PCR.

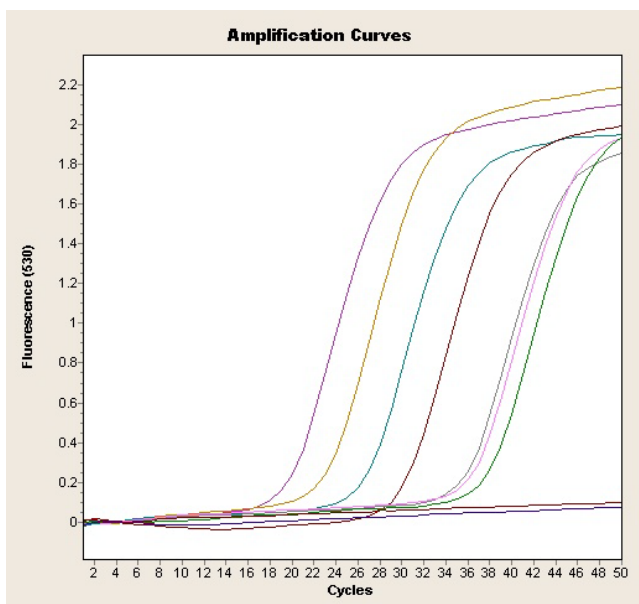
Tab č.16. *Naměřené hodnoty naředěných vzorků kmene SA real-time PCR*

pozice vzorku	označení vzorku	CP
MM č. 3, 3mM Mg ²⁺		
1	Kmen SA 10 x ředěno	19,48
2	100 ředěno	23,02
3	1000 x ředěno	26,50
4	10 000 x ředěno	30,62
5	100 000 x ředěno	34,93
6	1 000 000 x ředěno	
7	10 000 000 x ředěno	
8	100 000 000 x ředěno	
9	Ko -	
MM č. 4, 4 mM Mg ²⁺		
10	Kmen SA 10 x ředěno	18,23
11	100 ředěno	20,82
12	1000 x ředěno	24,90
13	10 000 x ředěno	29,35
14	100 000 x ředěno	33,55
15	1 000 000 x ředěno	35,61
16	10 000 000 x ředěno	36,02
17	100 000 000 x ředěno	
18	Ko -	

Obr. č.21. Amplifikační křivky jednotlivých vzorků získané pomocí real-time PCR, amplifikační směs č. 3 (Mg^{2+} kationty 3mM)



Obr. č.22. Amplifikační křivky jednotlivých vzorků získané pomocí real-time PCR, amplifikační směs č. 4 (Mg^{2+} kationty 4mM)



Důležitým faktorem pro správný průběh PCR je koncentrace Mg^{2+} kationtů. Při optimalizaci reakce se námjevilo jako nejlepší použití 4 mM Mg^{2+} kationty, ačkoli v původní práci používali koncentraci 6 mM Mg^{2+} kationty. Při optimalizaci reakce primerů a sond se nám osvědčilo použití kombinace následujících koncentrací: primery 0,4 mM, a sonda 0,2 mM.

Závěrem uvádíme v tabulce č.17. složení optimalizované reakční směsi pro real-time PCR SA a optimalizovaný teplotní profil.

Tab. č.17. Složení optimalizované reakční směsi pro real-time PCR SA

7,0 μ l směsi + 3,0 μ l templátové DNA (pozitivní kontroly nebo vody)		1 vzorek
voda		3,3 μ l
LC FastStart DNA Master HybProbe Kit (1a+1b) (10 \times)	1 \times	1,0 μ l
Mg ²⁺ (25 mmol/l)	4 mmol/l	1,6 μ l
primer fem -Fw (10 pmol/ μ l)	0,4 μ mol/l	0,4 μ l
primer fem-Rv (10 pmol/ μ l)	0,4 μ mol/l	0,4 μ l
sonda fem-FAM (10 pmol/ μ l)	0,2 μ mol/l	0,2 μ l
UNG (1U/ μ l)	0,1 U	0,1 μ l

Příprava mixu 1a+1b: přidat 60l LC FastStart Reaction Mix HybProbe 1b (bezbarvé víčko) k LC FastStart Enzyme 1a (červené víčko).

Hydrolytická sonda – zásobní sonda - sonda fem-FAM - je připravena v zásobní koncentraci 100 pmol/ μ l, pracovní sonda je ředěna na koncentraci 10 pmol/ μ l .

Teplotní profil:

- 50 °C 2 min.
- 95 °C 10 min.
- 50 \times (95 °C 10 s; 60°C 40 s.)
- 40 °C 30 s

Detekce: záznam fluorescence (FAM) na konci každého cyklu (při 60 °C)

Odečet – kanál F1

3.4. VALIDACE REAL-TIME METODY

3.4.1. Opakovatelnost měření

Opakovatelnost měření (přesnost v sérii) jsme stanovili pomocí nařaděného kmene SA. Vzorek o dané koncentraci jsme zanalyzovali v sérii deseti měření během jediného dne. Z naměřených hodnot jsme vypočítali průměr, směrodatnou odchylku (SD) a variační koeficient (CV). Výsledky měření udává tabulka č. 22.

Tab. č.18. *Opakovatelnost měření*

	Kmen SA
	Ct
	19,02
	19,13
	19,49
	19,00
	19,07
	19,32
	18,85
	19,23
	19,08
	18,94
průměr	19,113
SD	0,189270529
CV (%)	0,990271174

3.4.2. Reprodukovatelnost měření

Přesnost měření v rámci několika dnů byla stanovena opakovaným měření naředěného kmene SA. Vzorek byl měřen sedm po sobě následujících dnů. Z naměřených hodnot jsme vypočítali průměr, směrodatnou odchylku (SD) a variační koeficient (CV). Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.19.

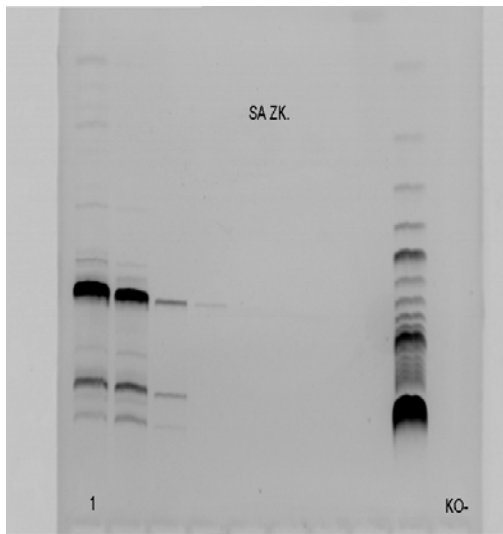
Tab. č.19. *Reprodukovatelnost měření*

	Kmen SA
	Ct
	29,02
	26,06
	26,00
	27,47
	24,36
	25,05
	27,23
průměr	26,03
SD	1,21
CV (%)	4,63

3.4.3. Citlivost – senzitivita real-time PCR

Mez citlivosti jsme určili pomocí desítkového ředění kmene SA a porovnali nově optimalizovanou real-time PCR s původní standardní PCR reakcí s elektroforetickou detekcí. Provedli jsme ředění kmene SA $10 \times$ (tj. $10^{-1} \times$) – $10^{-8} \times$ a porovnali výsledky pozitivitu (obr.č. 23.)

Obr.č.23. *Elektroforetická detekce ředěného kmene Staphylococcus aureus standardní PCR*

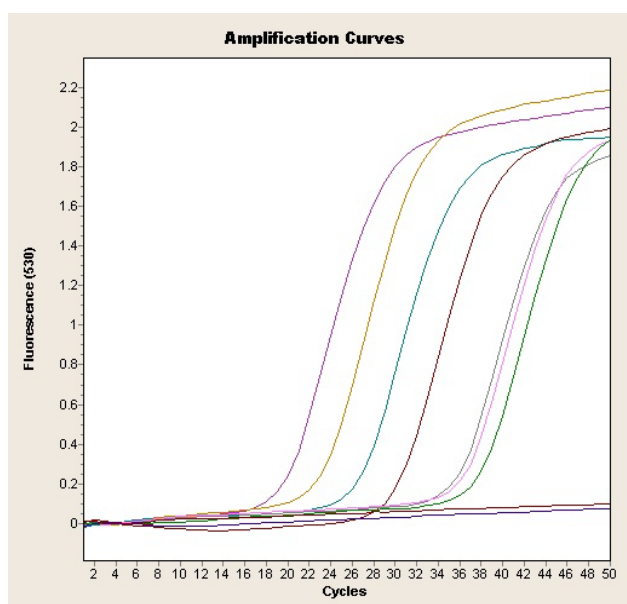


1 2 3 4 5 6 7 8 M 9

Vysvětlivky k obrázku č. 23.

1. vzorek č.1 10^{-1} ředěný kmen SA
2. vzorek č.2 10^{-2} ředěný kmen SA
3. vzorek č.3 10^{-3} ředěný kmen SA
4. vzorek č.4 10^{-4} ředěný kmen SA
5. vzorek č.5. 10^{-5} ředěný kmen SA
6. vzorek č.6 10^{-6} ředěný kmen SA
7. vzorek č.7 10^{-7} ředěný kmen SA
8. vzorek č.8 10^{-8} ředěný kmen SA
- M velikostní marker po 50 bp (Roche, M XIII)
9. negativní kontrola

Obr. č. 24. Detekce ředěného kmene *Staphylococcus aureus* real –time PCR



Tab. č.20. Výsledky detekce ředěného kmene *Staphylococcus aureus*

	SA10 ⁻¹	SA10 ⁻²	SA10 ⁻³	SA10 ⁻⁴	SA10 ⁻⁵	SA10 ⁻⁶	SA10 ⁻⁷	SA10 ⁻⁸
RT PCR (hodnota Ct)	18,23	20,82	24,90	29,35	33,55	35,61	36,02	neg
PCR/ ELFO Poz/neg	+++	+++	+	nejasný	-	-	-	-

Vysvětlivky k tabulce č.20.

+++ pozitivní vzorek

+ slabě pozitivní vzorek

- negativní vzorek

Metoda real-time PCR je přibližně o 4 dekadické řády více citlivá než původní metoda standardní PCR s elektroforetickou detekcí.

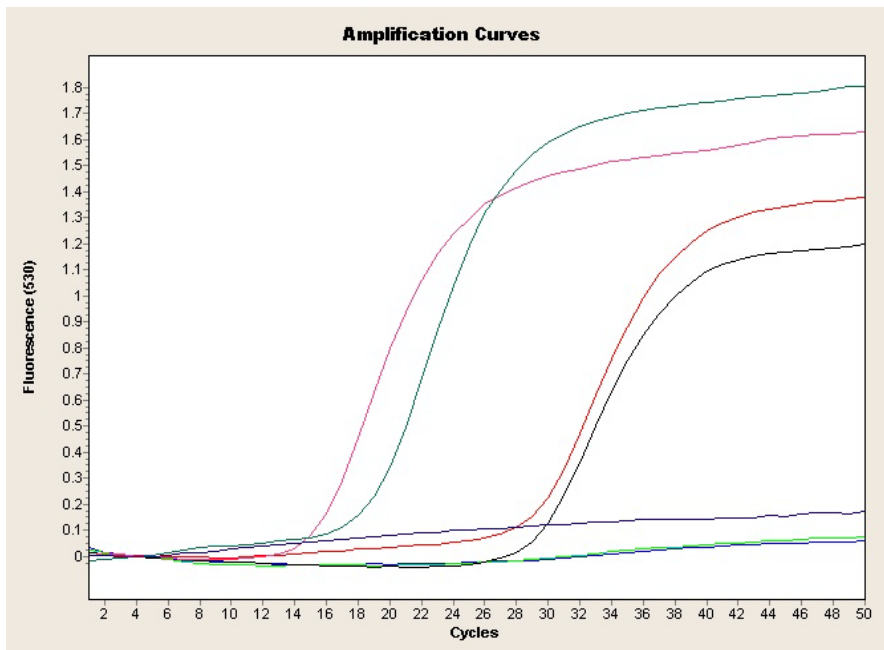
Specifita reakce byla ověřena virtuálním systémem National Center for Biotechnology Information (NCBI) pomocí programu BLAST. Výsledek vyhledání uvádíme v tabulce č.21.

Tabulka č. 21. *Specifita reakce – program BLAST*

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
BA000017.4	Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu50 DNA, complete genome	<u>53.6</u>	96.3	73%	6e-05	100%
CP000046.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus COL, complete genome	<u>53.6</u>	96.3	73%	6e-05	100%
CP000253.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus NCTC 8325, complete genome	<u>53.6</u>	96.3	73%	6e-05	100%
CP000255.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300, complete genome	<u>53.6</u>	96.3	73%	6e-05	100%
AF105976.2	Staphylococcus aureus FmhB (fmhB) gene, complete cds; and unknown genes	<u>53.6</u>	96.3	73%	6e-05	100%
BX571857.1	Staphylococcus aureus strain MSSA476, complete genome	<u>53.6</u>	96.3	73%	6e-05	100%
BA000033.2	Staphylococcus aureus subsp. aureus MW2 DNA, complete genome, strain:MW2	<u>53.6</u>	96.3	73%	6e-05	100%
BA000018.3	Staphylococcus aureus subsp. aureus N315 genomic DNA, complete genome	<u>53.6</u>	96.3	73%	6e-05	100%
AF106850.1	Staphylococcus aureus FmhB (fmhB) gene, complete cds	<u>53.6</u>	96.3	73%	6e-05	100%
AJ938182.1	Staphylococcus aureus RF122 complete genome	<u>53.6</u>	96.3	73%	6e-05	100%
BX571856.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus strain MRSA252, complete genome	<u>50.0</u>	92.7	70%	7e-04	100%
AL671299.18	Mouse DNA sequence from clone RP23-281K21 on chromosome X, complete sequence	<u>37.4</u>	37.4	42%	4.7	86%

Na závěr uvádíme pozitivní záchyt DNA *Staphylococcus aureus* v likvoru pacienta s bakteriální meningitidou pomocí námi validované metody real-time PCR (obr.č.25.).

Obr.č.25. *Pozitivní záchyt DNA SA v CSF - validovaná metoda real-time PCR*



Popis vzorku	CP
Pacient A (modrá)	negativní
Pacient A (zelená)	negativní
Pacient B (červená)	33,75
Pacient B (černá)	34,39
Pozitivní ko + (růžová)	19,73
Pozitivní ko + 10 x ředěná (tmavě zelená)	22,64
Ko – (tmavě modrá)	negativní

3.5.VÝSLEDKY

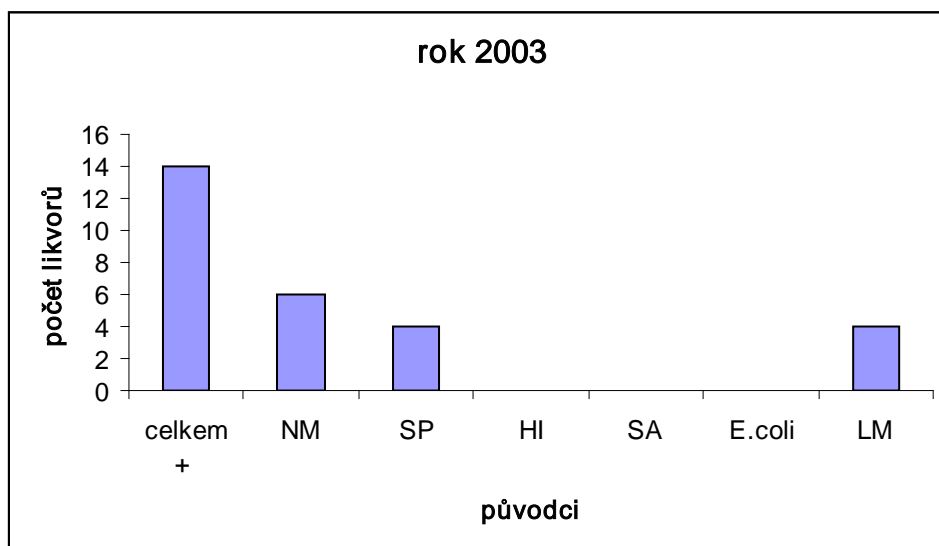
Údaje, jichž se týká následující komentář jsou uvedeny v tabulkách, které jsou připojeny za tímto komentářem.

V letech 2003 – 2006 bylo vyšetřeno celkem 197 CSF na přítomnost DNA původců bakteriálních meningitid. Jednalo se o *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes*. Metodou PCR byly vyšetřeny pouze likvory, u kterých buď nebyl klasickými mikrobiologickými technikami detekován původce bakteriální meningitidy (mikroskopie, kultivace, aglutinace) a nebo se jednalo o původce nejednoznačně prokázané.

Tab. č.22. Průkaz jednotlivých původců bakteriálních meningitid v roce 2003

celkem CSF	celkem pozit	NM	SP	HI	SA	E.coli	LM
44	14	6	4	0	0	0	4

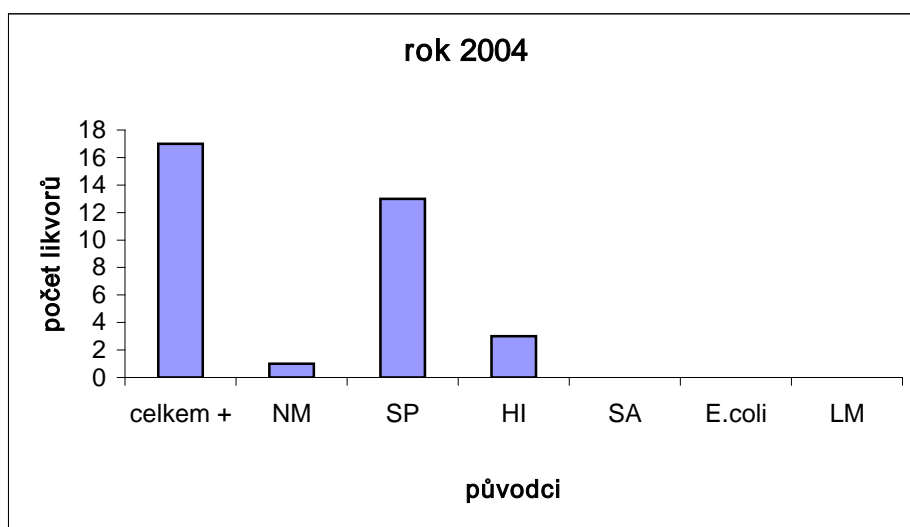
Graf č.1. Zastoupení prokázaných původců bakteriálních meningitid v roce 2003 v pozitivních likvorech



Tab. č.23. Průkaz jednotlivých původců bakteriálních meningitid v roce 2004

celkem CSF	celkem pozit	NM	SP	HI	SA	E.coli	LM
46	17	1	13	3	0	0	0

Graf č.2. Zastoupení prokázaných původců bakteriálních meningitid v roce 2004 v pozitivních likvorech

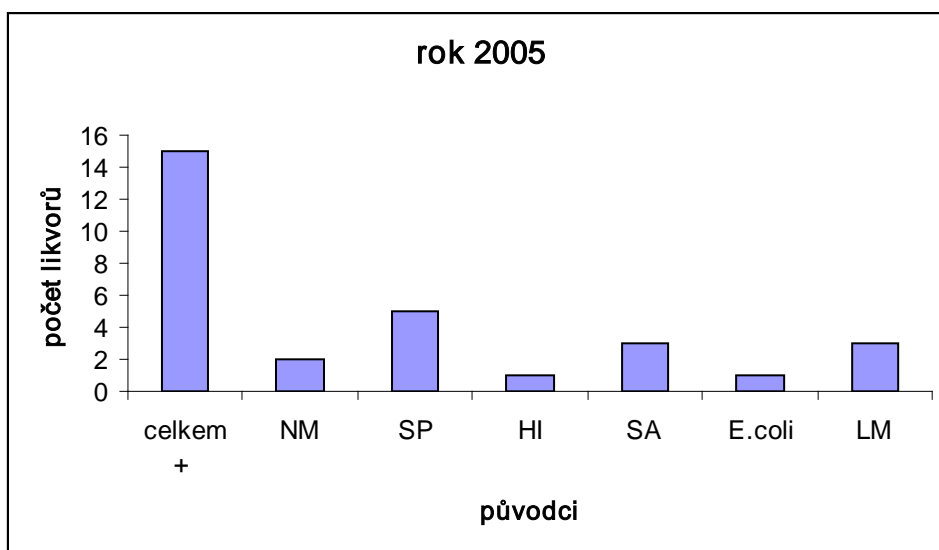


Tab. č.24. Průkaz jednotlivých původců bakteriálních meningitid v roce 2005

celkem CSF	celkem pozit	NM	SP	HI	SA	E.coli	LM
48	15	2	5	1	3	1	3

Graf č.3. Zastoupení prokázaných původců bakteriálních meningitid v roce

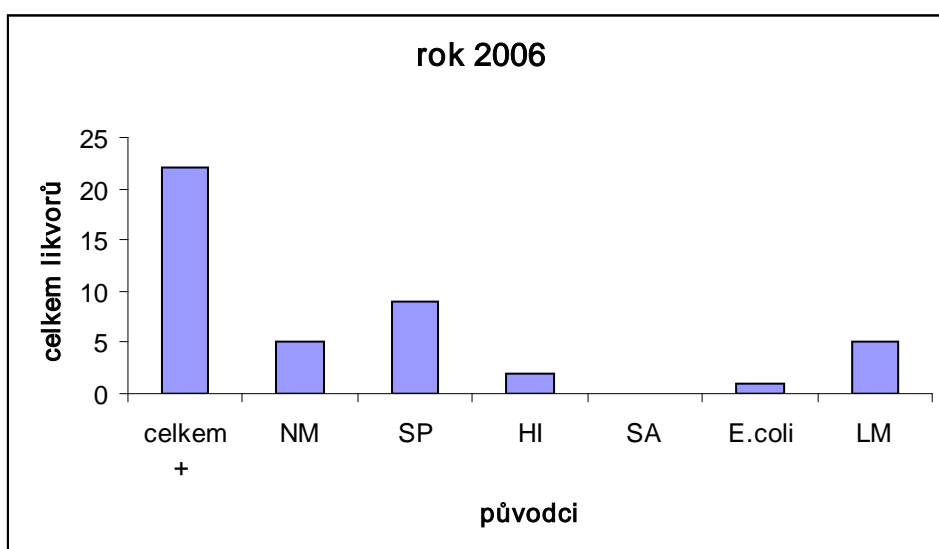
2005 v pozitivních likvorech



Tab. č.25. Průkaz jednotlivých původců bakteriálních meningitid v roce 2006

celkem CSF	celkem pozit	NM	SP	HI	SA	E.coli	LM
59	22	5	9	2	0	1	5

Graf č.4. Zastoupení prokázaných původců bakteriálních meningitid v roce 2006 v pozitivních likvorech

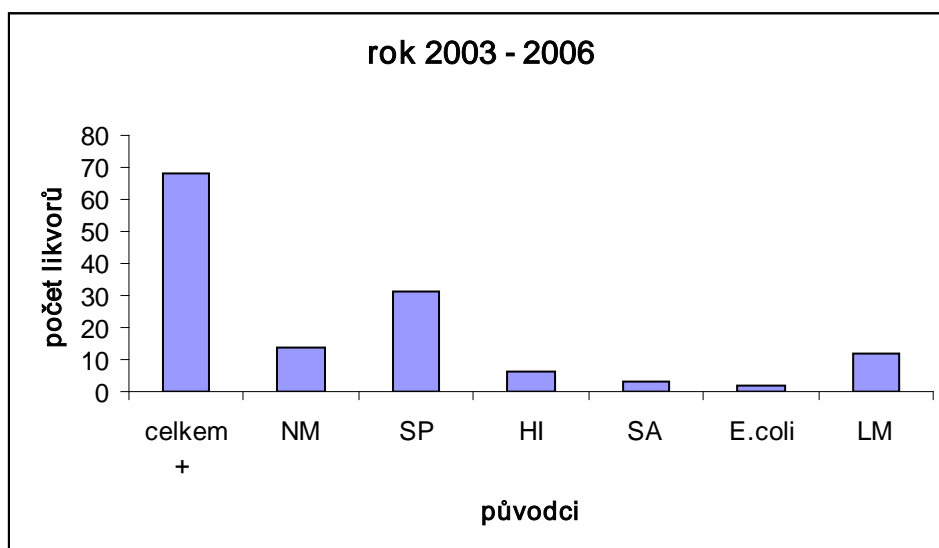


Tab. č.26. Průkaz jednotlivých původců bakteriálních meningitid v letech

2003 – 2006

celkem CSF	celkem pozit	NM	SP	HI	SA	E.coli	LM
197	68	14	31	6	3	2	12

Graf č.5. Zastoupení prokázaných původců bakteriálních meningitid v letech 2003 - 2006 v pozitivních likvorech



Vysvětlivky k tabulkám a grafům

Celkem CSF – celkový počet vyšetřených likvorů molekulárně biologickými technikami

Celkem pozit - celkový počet pozitivních průkazů v likvoru molekulárně biologickými technikami

NM - počet pozitivních průkazů v likvoru - původce *Neisseria meningitidis*

SP - počet pozitivních průkazů v likvoru - původce *Streptococcus pneumoniae*

HI - počet pozitivních průkazů v likvoru - původce *Haemophilus influenzae*

SA - počet pozitivních průkazů v likvoru - původce *Staphylococcus aureus*

E. coli - počet pozitivních průkazů v likvoru - původce *Escherichia coli*

LM - počet pozitivních průkazů v likvoru - původce *Listeria monocytogenes*

4. DISKUZE

Diagnostika bakteriálních meningitid byla donedávna založena pouze na mikrobiologickém průkazu etiologického agens (mikroskopie, kultivace, aglutinace). Je všeobecně známo, že se těmito klasickými mikrobiologickými metodami objasní přibližně 70% případů. U zbývajících 30% bakteriálních meningitid není nalezeno etiologické agens.

V devadesátých letech došlo k nástupu molekulárně biologických metod do mikrobiologické diagnostiky nejdříve ve virologii. Postupně se tyto metody začaly prosazovat i do dalších odvětví mikrobiologie, a to bakteriologie, parazitologie a mykologie. Důvodem využití molekulárně biologických metod v bakteriologii byla především rychlost, zvýšení specifity a senzitivity. Právě z těchto důvodů se začaly používat molekulárně biologické metody v diagnostice bakteriálních meningitid k průkazu etiologického agens.

Velmi důležitá je také možnost průkazu bakteriální DNA po zahájení antibiotické léčby. V těchto případech je kultivace bezcenná a přínosem je právě možnost průkazu DNA z degradované bakterie.

Vysoká rychlost průkazu je důležitá u závažných akutně probíhajících bakteriálních meningitid, jejichž původcem je nejčastěji *Neisseria meningitidis*, kdy se podle klinických příznaků antibiotická léčba zahajuje okamžitě ještě v terénu. Brzké zahájení antibiotické léčby je velmi důležité z důvodů přežití pacienta, nicméně po zahájení léčby již nelze kultivačně etiologické agens potvrdit. Právě v těchto případech je průkaz etiologického agens pomocí PCR nenahraditelné.

Mezi další nejčastější původce bakteriálních meningitid patří *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, a *Listeria monocytogenes*.

Bakteriálních meningitid vyvolaných *Haemophilus influenzae* v dětském věku postupně ubývá, protože v České republice byla v roce 2001 zahájena plošná vakcinace.

Streptococcus pneumoniae je jednou z nejčastějších příčin bakteriálních meningitid. Zvýšené riziko pro infekce mají děti mladší dvou let, dospělí a osoby starší šedesáti pěti let.

Z těchto důvodů byla v letech 2000 – 2001 na oddělení molekulární biologie ÚKBD optimalizována a použita zejména standardní PCR pro průkaz *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*.

V některých případech z důvodů zvýšení citlivosti optimalizována a použita nested PCR (průkaz *Listeria monocytogenes*).

Všechny tyto metody mají elektroforetickou detekci DNA původců na agarózovém gelu barveném ethidium bromidem.

Postupně byla diagnostika doplněna o průkaz původců vyvolávající bakteriální meningitidy v kojeneckém věku, a to *Escherichia coli* a *Streptococcus agalactiae*.

Vzhledem k náročnosti a poměrně vysoké ceně nebyly zaváděny další vyšetření etiologických agens, které vyvolávají bakteriální meningitidy velmi zřídka.

Průkaz DNA *Staphylococcus aureus* pomocí standardní PCR nebyl příliš citlivý a v některých případech velmi nespecifický. Na gelu se objevovaly nespecifické bandy a interpretace výsledků byla velmi obtížná. Z tohoto důvodu jsme přistoupily k zavedení real-time techniky pro průkaz *Staphylococcus aureus*, která se v poslední době stále více využívá nejen z důvodů kvantifikace, ale i k zvýšení rychlosti a specifity reakce.

Real-time PCR je metoda rychlá, vysoce citlivá a specifická, která umožňuje průběžné sledování tvorby PCR produktů již během jednotlivých amplifikačních cyklů v reálném čase, tzv. real-time PCR. Výhodou této metody je především její pružnost, jednoduchost provedení, časová nenáročnost, široké detekční rozmezí v rozsahu několika řádů, vysoká citlivost, specifičnost a reprodukovatelnost měření a také dobrá klinická relevance výsledků.

Při zavádění metody jsme vycházeli z publikace Klotz M., Opper S., Heeg K., Zimmermann S. „*Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR.*“

V této práci popisujeme real-time PCR metodu pro průkaz DNA *Staphylococcus aureus* prováděnou na přístroji LightCycler 2.0. Při zavádění metody jsme využili specifický *fem* gen (39), primery a hydrolitickou TaqMan sondu FAM/BHQ1, kterou nám dle našich požadavků navrhla firma Geneti Biotech (Česká Republika).

V laboratoři jsme provedli optimalizaci a dále její validaci na přístroji LightCycler 2.0.

Výhodou námi zaváděné real-time PCR metody na přístroji LightCycler 2.0 je práce s malými reakčními objemy. PCR na přístroji LightCycler 2.0 probíhá ve skleněných kapilárách ve výsledném reakčním objemu 10, což přináší snížení finančních nákladů. Kapiláry z borosilikátového skla značně zkracují čas amplifikace, protože střídání teplot PCR je velmi rychlé.

Úpravou reakčních podmínek při následujících měřeních jsme se pokoušeli zvýšit citlivost reakce. Zaměřili jsme se zvláště na koncentraci hořčnatých iontů a zkrácení časových profilů jednotlivých částí real-time PCR. Při optimalizaci reakce se nám jevílo jako nejlepší použití 4 mM Mg²⁺ kationty, ačkoli v původní práci používali koncentraci 6 mM Mg²⁺ kationtů.

Ve snaze zrychlit celý proces reakce jsme zkusili zkrátit časy denaturace a annealingu. Původní časy denaturace jsme zkrátili o 5 sekund na výsledných 10 sekund. Původní časy annealingu jsme upravili na 40 sekund místo původních 60 sekund. Zjistili jsme, že citlivost reakce zůstala nezměněna. Při dalších experimentech jsme používali zkrácené časy denaturace i annealingu.

Variační koeficienty opakovatelnosti (CV 0,990271174%) a reprodukovatelnosti (CV 4,63%) zjišťované v rámci validace metody odpovídají variačním koeficientům uváděným v literatuře.

Real-time PCR pro průkaz DNA *Styphylococcus aureus* není metodou kvantifikační, protože z klinických důvodů není kvantifikace důležitá. Důležité je vyhledání etiologického agens, proto bylo naší snahou optimalizovat metodu s nejvyšší citlivostí. Pomocí desítkového ředění kmene SA jsme porovnali nově optimalizovanou real-time PCR s původní standardní PCR. Metoda real-time PCR je přibližně o 4 dekadické řády více citlivá než původní metoda standardní PCR s elektroforetickou detekcí.

Nejčastěji používaným materiálem pro diagnostiku původců bakteriálních meningitid je likvor, který se získává lumbální punkcí. Pro izolaci DNA jsme používali standardizovaný komerční kit QIAampDNA Mini Kit (250) firmy QIAGEN. Principem izolace je zachycení DNA ve formě krystalků na kolonce.

Vzhledem k tomu, že v likvoru není mnoho proteinů a inhibitorů (např. erytrocyty), izolace není náročná a likvor nebývá často inhibován. Někdy se s inhibicí setkáváme u hnisavých a krvavých likvorů. Inhibicím se proto

snažíme zabránit tím, že likvor je zpracováván v duplikátech. Jedna část je centrifugována, druhá se používá nativní. Do reakce je bráno 0,2 ml nativního likvoru .

Ke zvýšení citlivosti asi o jeden řád je vhodné likvor o objemu 1- 2ml centrifugovat při 13 000 rpm po dobu 10 min. Dále je zpracovávána 0, 2 ml peleta.

Tento postup je nevhodný u pacientů, u kterých byla zahájena antibiotická léčba, protože v likvoru již může být přítomna dezintegrovaná bakteriální DNA, která je po centrifugaci vyplavována do supernatantu a v sedimentu zůstávají pouze proteinové zbytky. Tímto by mohlo dojít k vydání falešně negativních výsledků.

V letech 2003 – 2006 bylo od pacientů s diagnózou bakteriální meningitidy na průkaz nejčastějších původců (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* , *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes*) vyšetřeno metodou PCR 197 likvorů, u kterých buď nebyl klasickými mikrobiologickými technikami detekován původce bakteriální meningitidy (mikroskopie, kultivace, aglutinace) a nebo se jednalo o původce nejednoznačně prokázané (aglutinace – nejednoznačná, kultivace – negativní).

Ve velmi malém počtu byly zpracovány likvory okamžitě bez výsledků kultivace, pouze po provedení mikroskopie a hemaglutinace. V případě negativit těchto dvou vyšetření se okamžitě zahajuje vyšetření pomocí PCR. Tento postup se používá u pacientů s velmi těžce probíhající bakteriální meningitidou.

Pomocí PCR byla v 68 likvorech zachycena pozitivita, některého z požadovaných vyšetřovaných agens.

Pokud uvažujeme, že molekulárně biologickými technikami jsme vyšetřovali pouze likvory neobjasněné klasickými mikrobiologickými metodami, tak 197 vyšetřených likvorů tvoří 30%.

V tomto případě objasněnost dalších 68 likvorů znamená zvýšení etiologického průkazu původce o 10%. V současné době je tedy minimálně 80% všech bakteriálních meningitid etiologicky objasněno a tím je možné u těchto pacientů zahájit cílenou antibiotickou terapii.

Pneumokokové meningitidy patří k nejčastějším meningitidám. I v naší laboratoři byl v 50% jako původce detekován *Streptococcus pneumoniae*.

Zvýšený počet průkazů *Listeria monocytogenes*, který se objevil v roce 2006 přičítáme proběhlé epidemii v České republice.

Do budoucna bude snahou pracoviště molekulární biologie optimalizovat tzv. panel real-time PCR pro nejčastější původce bakteriálních meningitid.

Vzhledem k tomu, že se jedná o „statim“ vyšetření a je potřeba u jednoho pacienta provést 3 – 5 reakcí současně, je velmi ekonomické provádět tato vyšetření na jednom přístroji. Toto umožní použití hydrolytických TaqMan sond, které se používají při stejném teplotním profilu (denaturace 95⁰C, 15 s, annealing 60⁰C, 40 s – 1 min) u všech použitých metod.

Výsledkem použití tohoto panelu metod bude zejména zrychlení vyšetření.

5. ZÁVĚR

V poslední době nalézají molekulárně biologické techniky široké uplatnění v mikrobiologické diagnostice, neboť umožňují na základě analýzy DNA nebo RNA získaných z různého biologického materiálu prokazovat mikroorganismy odpovědné za příslušná onemocnění.

Analýza je vysoce specifická, citlivá a relativně rychlá. Průkaz DNA (event. RNA) pomocí PCR se řadí vedle mikroskopických a kultivačních technik k přímým metodám mikrobiologické diagnostiky.

Metoda real-time PCR na *Staphylococcus aureus* byla optimalizována a validována v laboratoři molekulární biologie Ústavu klinické biochemie a diagnostiky v Hradci Králové.

Nám se podařilo pomocí molekulárně biologických technik zvýšit objasněnost nejčastějších původců bakteriálních meningitid *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes* o 10%.

Zavedením techniky real-time PCR se zvýšila atraktivita molekulárně biologické diagnostiky pro klinické pracovníky díky vyšší rychlosti, menšímu riziku kontaminace, nižší pracnosti a stále se zvyšující reprodukovatelnosti.

LITERATURA

1. DUNIEWICZ, P., ADAM, P., BOHUTOVÁ, J., HANČIL, J., STAŇKOVÁ, M.: Neuroinfekce, Maxdorf, Praha, 1999, s.10-11, 21-42, 67-83, 86-99, 187-203. ISBN 80-85800-72-1
2. BEDNÁŘ, M.: Molekulárně genetické metody v rutinní mikrobiologické diagnostice. *Remedia Klin. Mikrobiol.*, 1997, roč. 1, č. 4, s. 115-122.
3. ZAHRADNICKÝ, J. a kolektiv: Mikrobiológia a epidemiológia, vyd. Osveta, 1991, s. 238-241. ISBN 80-217-0326-1
4. [http://gripsdb.dimdi.de/rochelexikon/pics/NEISSERIA\\$1.html](http://gripsdb.dimdi.de/rochelexikon/pics/NEISSERIA$1.html)
5. HAVLÍK, J. a autorský kolektiv: Infektologie – učebnice pro lékařské fakulty, Avicenum, Praha, 1990, s. 52-56, 99-106, 119-120, 122-124, 132-137, 162-164. ISBN 80-201-0062-8
6. <http://opt.pacificu.edu/ce/catalog/13036-AS/Antibiot.html>
7. <http://www.textbookofbacteriology.net/normalflora.html>
8. <http://www.genomic.ch/staphylococcus.php>
9. BEDNÁŘ, M., SOUČEK, A., VÁVRA, J.: Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie, Triton, Praha, 1994, s. 22-27. ISBN 80-901521-4-7
10. http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterio_web/exa_microscopiques/bgn/Escherichia_coli_Hemo_c.htm
11. <http://aapredbook.aappublications.org/week/iotw070405.shtml>

12. POHLREICH, P., MATOUŠ, B.: Molekulární biologie a medicina Prakt. LÉK., 1995, roč. 75, č.2, s.56-63
13. ADAM, P., TÁBORSKÝ, L., SOBEK, O., KELBICH, P.: Cytology of Cerebrospinal Fluid., 1st ed., Praha, Medica News Publishers, 2003
14. ADAM, P., ANDRÝS, C., FRIEDECKÝ, B., et al.: Doporučení k vyšetřování mozkomíšního moku. Klin. Biochem. Metabol., 2006, 14(35): s. 125-127
15. ADAM, P., NEKOLA, P., ZEMAN, D., et al.: Rutinní diagnostické možnosti cytologie mozkomíšního moku. Ověření návrhu klasifikace cytologických nálezů, klinický přínos a meze používání metodik. Klin. Biochem. Met., 6(27): 1998,
16. ADAM, P.: Cytologie likvoru. 1st ed., Pardubice, Stapro, 1995.
17. BEDNÁŘ, M.: Molekulárně genetické metody rutinní mikrobiologické diagnostice. Remedia Klin. Mikrobiol., No 4,s. 115-122
18. KRČMÁŘ, M., BŘICHÁČEK, B.: Molekulárně biologické metody vevirologické diagnostice. 1. vyd. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno, 1993, s. 4-42. ISBN 80-7013-143-8
19. SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T.: Molecular cloning. A laboratory manual. 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, s. 6.3-6.35, 14.5-14.21. ISBN 0-87969-309-6
20. ROZSYPAL, S., DOŠKAŘ, J., PETRZIK, K., RŮŽIČKOVÁ, V.: Úvod do molekulární biologie. Díl. 4., 3. vyd., Brno, 2002, s. 1104-1105, 1091-1092. ISBN 80-902562-4-4

21. KŘEMEN, J., POHLREICH, P., STŘÍBRNÁ, J.: Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně. Karolinum, Praha, 1998, s. 33-36, 80-83. ISBN 80-7184-504-3
22. MULLIS, K. B., FERRÉ, F., GIBBS, R. A.: The polymerase chain reaction. Birkhäuser, Boston, 1994. ISBN 0-8176-3750-8, ISBN 3-7643-3750-8
23. RONAI, Z., YAKUBOVSAJA, M.: PCR in clinical diagnosis. J. Clin. Lab. Anal., 1995, roč. 9, č. 4, s. 269-283
24. TANG, Y.-W., PROCOP, G.W., PERSING, D.H.: Molecular diagnostics of infectious diseases. Clin. Chem., 1997, roč. 43, č. 11., s. 2021-2036
25. http://www.biologydaily.com/biology/Polymerase_chain...25
26. HROCHOVÁ, K., PLÍŠKOVÁ, L., FRIEDECKÝ, B., PALIČKA, V.: Kontrola kvality v molekulárně biologické diagnostice extrahumánního genomu. Klin. Mikrob. A Infekční Lékařství 9, 2003, No. 5, s. 263-265
27. www.gene-quantification.info
28. www.Perlinks.com
29. Roche Molecular Biochemicals LightCYCLER Operator's Manual (version 3. , April 2000)
30. www.szu.com/zpravy/zpr0202/pcr.htm (PRILOGOVÁ, M., KÖNIG, J.: Kvantitativní PCR (Q-PCR))
31. www.tib-molbiol.com/lightcycler/index.html
32. <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html-101k>

33. QIAamp DNA Mini Kit and Blood Mini Kit Handbook (QIAGEN, February 2003)
34. TAHA, M. K.: Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Nisseria meningitidis*, J. of Clin. Microbiology, Feb. 2000, s. 855-857
35. SARUTA, K., MATSUNAGA, T., KONO, M., HOSHINA, S., KANEMOTO, S., SAKAI, O., MACHIDA, K.: Simultaneous detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by nested PCR amplification from cerebrospinal fluid samples, FEMS Immunology and Medical Microbiology 19, 1997, s. 151-157
36. VANNUFFEL, P.: Rapid and specific mol. Identification of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiology, Aug. 1998, s. 2366-2368
37. JUCH, D.: Nested PCR protocol for the rapid detection of *Escherichia coli* in potable water, Can J. Microbiology 42. 1996, s. 862-866
38. JATON, K., SAHLI, R., BILLE, J.: Development of PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in clinical cerebrospinal fluid samples, J. of Clin. Microbiology, Aug. 1992, s. 1931-1936
39. KLOTZ, M., OPPER, S., HEEG, K., ZIMMERMANN, S.: Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay, J. of Clin. Microbiology, Oct. 2003, s. 4683-4687

