

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

## **REAL - TIME PCR V DIAGNOSTICE INFEKČNÍ NEMOCI**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce : Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Školitel specialista : MUDr. Emil Pavlík CSc.

Hradec Králové 2008

Jaroslava Paldusová

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za vedení při zpracování této práce. Dále chci poděkovat školiteli specialistovi MUDr. Emilu Pavlíkovi CSc. za cenné připomínky a odborné zkušenosti, které přispěly ke kvalitě této práce. V neposlední řadě děkuji laborantce úseku BIOMOL FNKV v Praze paní Zuzaně Mühlsteinové za předání praktických zkušeností a předvedení metod.

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

V Praze dne 20.5.2008

Jaroslava Paldusová

# Abstrakt

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

Vypracovala: Jaroslava Paldusová  
Vedoucí bakalářské práce: Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.  
Školitel specialista: MUDr. Emil Pavlík, CSc.  
Název bakalářské práce: Real-time PCR v diagnostice infekční nemoci

Metody založené na polymerázové řetězové reakci umožňují identifikovat vybrané sekvence nukleové kyseliny pomocí její amplifikace. Tyto techniky přinášejí možnost rychlé detekce infekčního agens v mikrobiologii s velkou specifitou a citlivostí. V první části práce je zmíněn princip metody, typy a výhody jednotlivých technik PCR. Skutečným vývojovým průlomem v rozvoji metody bylo zavedení techniky PCR v reálném čase, která je založena na kombinaci amplifikace a současnou fluorescenční detekcí množství amplikonů v každém cyklu a to pomocí specifických sond, které v této části také zmiňuji. V druhé části se věnuji diagnostice infekčních nemocí, nástup těchto technik napomáhá rychlé diagnostice infekčních onemocnění, umožňuje rozlišit subtypy infekčních agens, odhalit rozvíjející se rezistenci k antibiotikům. Dostupnost těchto metod, schopných zjistit vztah mezi virovou náloží, prognózou nemoci, jejím průběhem a odpovědí na léčbu hraje významnou roli v případě virových hepatitid a AIDS. Přes všechny výhody, které polymerázová řetězová reakce poskytuje, existují stále mnoha úskalí, které je třeba řešit, patří mezi ně možnost inhibice polymerasy ve vzorcích. Tomuto problému se věnuji v závěru své práce a dokládám výsledky studie inhibice u vzorků vyšetřovaných na přítomnost *Chlamydia trachomatis*, která byla na našem pracovišti prováděna v uplynulých letech. Molekulárně biologické metody se v dnešní době bouřlivě rozvíjejí, což pravděpodobně v brzké budoucnosti zvýší jejich dostupnost pro klinická pracoviště.

## **Abstract**

CHARLES UNIVERSITY PRAGUE

FACULTY OF PHARMACY HRADEC KRÁLOVÉ

Chair of biochemical science

Autor: Jaroslava Paldusová

Tutor: Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Consulting Specialist: MUDr. Emil Pavlík, CSc.

Title: Real-time PCR in Diagnostics of Infectious Diseases

Techniques based on polymerase chain reaction allow identifying selected sequences of nucleic acid with the help of its amplification. In the field of microbiology, these techniques enable rapid detection of infectious agent with high specificity and high sensitivity. First part of this study describes principles, advantages and disadvantages of different PCR applications and alternative techniques. The revolutionary milestone in development of PCR presents real-time PCR technique based on combined amplification and detection of each newly synthesised amplicon by fluorescence signal in every cycle. The technique is also described in this part. The second part of this study presents applications in routine laboratory diagnostics of selected infectious diseases. Implementing of real-time PCR technique allows rapid diagnostics of pathogenous bacteria, viruses, fungi and parasites, determination of subtypes, antibiotic resistance and monitoring of infectious agent load in the host. Availability of such techniques helping to determine consequences among agent load, course of the disease and the disease prognosis plays highly important role e.g. in diagnostics of hepatitis. Despite all features of PCR, some problems remain to be solved: e.g. polymerase inhibition due to inhibitors present in some patients samples. This problem I described in the third part of my study, where the data on PCR inhibition in patient samples tested in recent years on *Chlamydia trachomatis* in our laboratory are summarised. Molecular Biology Techniques at present undergo intensive development. This fact might lead to their higher availability for clinical colleagues in very near future.

1. Úvod.....	1
2. Metody a princip stanovení.....	2
2.1. Hybridizační sondy pro detekci nukleových kyselin infekčních agens.....	2
2.2. Polymerázová řetězová reakce PCR.....	3
2.2.1. DNA - PCR.....	4
2.2.2. Reverzně transkripční PCR (RT - PCR).....	7
2.2.3. Nested PCR.....	8
2.2.4. Asymetrická PCR.....	9
2.2.5. TAS.....	9
2.2.6. 3 SR.....	9
2.2.7. NASBA®.....	10
2.2.8. TMA.....	13
2.2.9. SDA.....	13
2.3. Metody využívající amplifikaci signálu.....	14
2.3.1. bDNA.....	14
2.3.2. Compound Probes.....	15
2.4. Metody využívající amplifikaci hybridizační sondy.....	15
2.4.1. LCR.....	15
2.4.2. Q-beta replikázová reakce.....	16
3. Detekce produktu PCR.....	17
3.1. End-point PCR.....	17
3.1.1. Komparativní Q-PCR.....	17
3.1.2. Kompetitivní Q-PCR.....	17
3.2. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	18
3.2.1. Sondy TaqMan®.....	19
3.2.2. FRET - sondy.....	20
3.2.3. Molecular Beacons.....	21
3.2.4. SimpleProbes™.....	22
3.2.5. Sondy Scorpions™.....	22
3.3. Identifikace produktů PCR analýzou křivky tání.....	23
3.4. Fáze PCR reakce.....	24
3.5. Shrnutí detekce real-time PCR.....	24
3.6. Kvantifikace a standardy.....	25
4. Příprava vzorku.....	26
4.1. Manuální.....	26
4.2. Automatizovaná izolace.....	26
5. Systémy pro rutinní diagnostiku.....	28
5.1. COBAS® Amplicor™ System.....	28
5.2. LightCycler™ System.....	29
6. Real-time PCR v diagnostice infekční nemoci.....	30
6.1. Využití PCR ve virologii.....	30
6.1.1. Virové hepatitidy.....	31
6.1.2. Herpetické viry.....	34
6.1.3. <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	35
6.1.4. <i>Treponema pallidum</i> .....	36
6.1.5. Mykobakterie.....	36
7. Riziko kontaminace a inhibice PCR.....	38

7.1. Inhibitory DNA polymerasy v biologických vzorcích .....	39
7.1.1. Studie inhibitorů DNA polymerasy na přítomnost <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	40
8. Budoucnost molekulárně biologických technik.....	44
9. Diskuze .....	45
10. Závěr .....	46
11. Seznam použité literatury .....	48
Použité zkratky .....	51

# 1. Úvod

K přímé identifikaci mikroorganismů se používá řada metod. Kultivační metody využívají schopnosti bakterií růst a množit se za vhodných chemických a fyzikálních podmínek při dostatečném přísunu živin a odvodu zplodin metabolismu. Mezi nejdůležitější nekultivační metody patří světelná a elektronová mikroskopie, biochemické testy, imunologické (průkaz antigenu) a molekulárně-genetické metody. Biochemické metody zjišťují řadu biochemických vlastností izolovaného bakteriálního kmene na speciálních půdách s přidáním indikátorů (tvorba indolu, sirovodíku, štěpení močoviny a další). Imunologické metody jsou založeny na vzniku komplexu antigen-protilátka, principem metody je značení antigenu nebo protilátky enzymem-enzymová imunoanalýza, při značení fluoreskujícím barvivem jde o imunofluorescenční analýzu, použití radionuklidů (beta nebo gama zářiče) se používá pro radioimunoanalýzu.

K nepřímému průkazu infekčních agens patří sérologické metody a používají stejný princip. Jsou-li antigen a protilátka kompatibilní, vážou se na sebe a tvoří imunokomplex. Při použití korpuskulárního antigenu (bakterie) se jeho vznik projeví shlukováním - aglutinací, použijeme-li antigen rozpustný (toxin), dojde k precipitaci. Pokud je protilátek v séru tak málo, že nevzniká viditelný precipitát, používá se komplement fixační reakce KFR, kdy se ke směsi vyšetřovaného séra a antigenu přidává komplement (tj. systém plazmatických bílkovin, které se kaskádovitě aktivují komplexem antigen-protilátka).

V letech 1983-1985 vyvinuli Mullis, Faloona a Saikki vysoce účinnou techniku, kterou se *in vitro* exponenciálně amplifikují vybrané sekvence nukleových kyselin. Technika se nazývá polymerázová řetězová reakce - PCR (Polymerase Chain Reaction). Podmínkou pro aplikaci této metody je znalost nukleotidové sekvence hledané nukleové kyseliny, na jejímž základě se připraví komplementární oligodeoxyribonukleotidy, které se vážou před a za hledanou oblast a slouží jako primery polymerační reakce. [1] Rozvoj technik syntézy nukleových kyselin znamenal významný posun v oblasti analýzy genomu prokaryotických i eukaryotických organismů pomocí komplementárních hybridizačních sond. Tím byly vytvořeny podmínky pro budoucí vznik diagnostických technik založených na detekci specifických úseků nukleových kyselin infekčních agens, jejichž nástup do rutinní diagnostiky lze datovat do 1. poloviny 90. let. Umožnil to pokrok v izolaci nukleových kyselin infekčních agens a vývoj amplifikačních technik PCR a zpřesnění



detekčních postupů. Ve druhé polovině 90. let (Cobas Amplicor 1996) nastupuje automatizace těchto metod a bouřlivý rozvoj přístrojové techniky, který zpětně ovlivňuje senzitivitu, specifitu a reprodukovatelnost testů. Se zvyšujícím se počtem genomových map infekčních agens, jak topografických, tak funkčních, směřuje další vývoj od prosté kvalitativní detekce striktních patogenů přes monitorování léčby pomocí kvantifikačních postupů k detekci jednotlivých genů kódujících faktory virulence mikrobů. Tím bude možné odlišit patogenní kmeny od nepatogenních přímo v biologickém materiálu.

## **2. Metody a princip stanovení**

Klasická genetika se rozvinula už před 2.světovou válkou. Ve 40.-50. letech se zjistilo, že pro genetické pokusy jsou bakterie velmi vhodným objektem, protože jsou haploidní a velmi rychle se množí. V bakteriální populaci se vlastnosti jedince stírají, ale na druhé straně je možné v ohromných populacích najít jednoduchou selekcí i mutace, které pro jejich vzácný výskyt u vyšších organismů vůbec zachytit nemůžeme.

V posledních letech se těžiště bakteriální genetiky více posouvá ke genetice molekulární, vědě, která se na pokusech s bakteriemi vyvinula a z níž naopak bakteriologie výhodně těží. Dnes můžeme nejen vysvětlit účinek různých látek na úrovni molekuly, kde působí, ale i cíleně vyrábět a testovat preparáty pro zásah na vybraném místě a to i pomocí mikrobů geneticky pozměněných metodami genového inženýrství. [2]

### **2.1. Hybridizační sondy pro detekci nukleových kyselin infekčních agens**

Hybridizační sondy jsou krátké úseky nukleových kyselin označené radionuklidem, chemiluminiforem, haptinem, antigenem nebo enzymem jako je alkalická fosfatáza nebo křenová peroxidáza. Jsou schopny se specificky vázat prostřednictvím vodíkových můstků ke komplementárním sekvencím řetězce nukleové kyseliny a to DNA i RNA. Pro praktické použití jsou nejlepší sondy oligonukleotidové, tj. kratší než 50 nukleotidů. Prvním, kdo v praxi využil hybridizačních sond, byl Moseley [3], jenž metodou DNA-DNA hybridizace prokazoval enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli* ve vzorcích stolice. Hybridizační sondy se používají k průkazu nukleových kyselin patogenních bakterií, virů, hub, plísní, parazitů i červů. Používají se nejen k přímému průkazu patogenního mikroba ve vzorku

biologického materiálu, ale také k identifikaci druhu v kultuře vyrostlého mikroba a některých jeho vlastností jako je např. rezistence na antibiotika. [3] Hybridizace mohou být v roztoku nebo na pevném nosiči, variantou na pevném nosiči je hybridizace *in situ*. Tato metoda, kromě detekce nukleové kyseliny infekčního agens, umožňuje posoudit morfolologii tkáně a rozlišit aktivní a latentní infekci. [4] Hybridizační metody nacházejí uplatnění v rutinní mikrobiologické diagnostice pro svou vysokou specifitu. Podmínkou je znalost konzervativní specifické sekvence, v níž se prakticky nevyskytují bodové mutace (variabilní část genomu nemůže sloužit jako cílová sekvence pro hybridizační sondu). Senzitivita diagnostických testů plně postačuje, chceme-li určit, zda mikroob, vypěstovaný v kultuře, geneticky odpovídá danému druhu či kmenu. Pokud však chceme prokázat původce infekce přímo v materiálu odebraném pacientovi, nemusí být citlivost metody dostačující. Proto se hledal způsob, jak sebenepatrnější množství nukleové kyseliny ve vzorku namnožit tak, aby byl zvolenou technikou prokazatelný. Řešením se staly **amplifikační techniky**. [3] [4]

## 2.2. Polymerázová řetězová reakce PCR

PCR je technika, kterou se *in vitro* exponenciálně amplifikují vybrané sekvence nukleových kyselin, tvoří ji řada polymeračních cyklů. Podmínkou pro aplikaci metody je sekvenční analýza studované nukleové kyseliny, na jejímž základě se připraví komplementární oligodeoxyribonukleotidy, které ohraničují amplifikovanou oblast a slouží jako primery polymerační reakce. Primery se připravují automatickou chemickou syntézou a dnes je lze získat od řady výrobců. Mnohonásobným zmnožením studované sekvence lze i z malého množství vzorku získat pomocí PCR dostatečné množství DNA pro další analýzu.

Amplifikační reakce probíhá většinou v tenkostěnných amplifikačních zkumavkách (objem 200 nebo 500  $\mu\text{l}$ ) v závislosti na typu cykleru. Moderní přístroje mají vyhřívané víko, což zabraňuje kondenzaci kapalně reakční směsi na vnitřní straně víka zkumavky a při jejím otevření na konci reakce rozstříknutí aerosolu a kontaminaci laboratoře produktem reakce. Pokud termocykler vyhřívané víko nemá, je nezbytné reakční směs převrstvit minerálním olejem, aby se zabránilo vypařování vzorku.

Reakční směs pro PCR se obvykle nazývá MasterMix a obsahuje

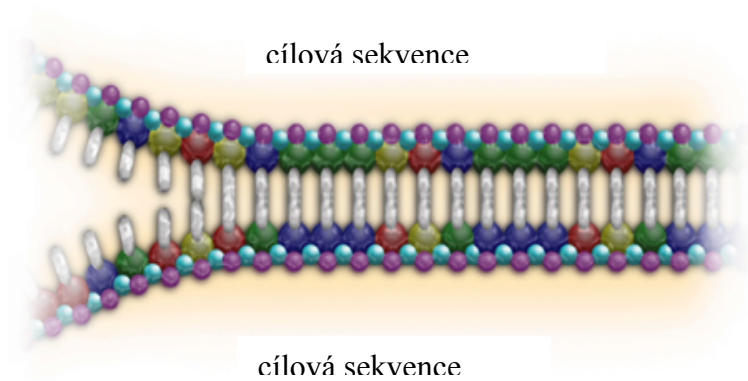
- Primery - syntetické jednovláknové oligonukleotidy, které ohraničují replikovaný úsek
- Polymerázu - většinou Taq polymeráza (*Thermus aquaticus*), dále např. Pfu (*Pyrococcus furiosus*), Tth (*Thermus thermophilus*).
- Mg<sup>2+</sup> ionty (obvykle MgCl<sub>2</sub>) pro optimální aktivitu enzymu.
- Pufř 50 mmol/l KCl, 10mmol/l Tris-HCl (pH 8,4 při 37 °C) případně další složky zvyšující výtěžnost reakce 0,05% Tween 20, Triton X-100 (potlačují tvorbu sek. struktur), albumin bovinního séra (BSA) nebo želatina (stabilizace polymerázy), dimetylsulfoxid nebo glycerol (usnadní změny teploty). Pufry jsou dodávány komerčně.
- Pro detekční účely mohou být složky reakční směsi označeny - primery na 5' konci biotinem nebo vhodným luminiforem.
- Dnes je již běžně používán patentem chráněný systém proti kontaminaci **AmpErase<sup>TM</sup>** (Uracil-N-glykosylasa). Pro degradaci fragmentů DNA z předchozí reakce je dTTP nahrazen dUTP.

### 2.2.1. DNA - PCR

Principem metody je amplifikace cílových úseků DNA mnohonásobným opakováním cyklů. První cyklus PCR má vždy prodlouženou denaturační fázi a poslední cyklus fázi polymerační. Každý cyklus tvoří následující fáze:

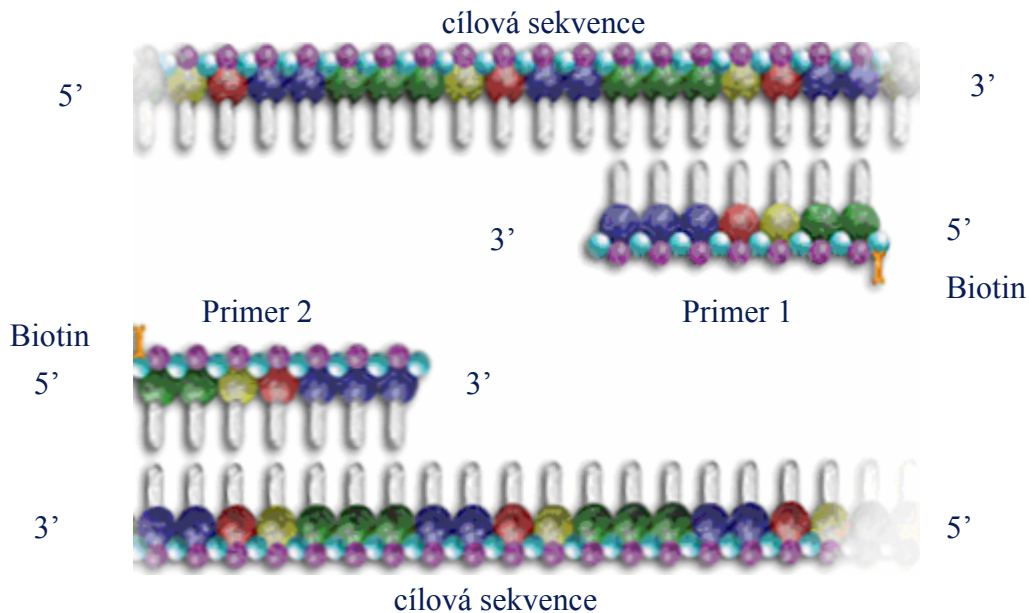
1. Tepelná denaturace DNA - při teplotě nad 90 °C jsou rozvolňovány vodíkové můstky spojující purinové a pyrimidinové baze komplementárních nukleotidů, čímž jsou od sebe oddělovány jednotlivé řetězce DNA. Výsledkem je jednořetězcová ssDNA.

V prvním cyklu se denaturace prodlužuje na 2 - 3 min a v následujících cyklech je 25 - 30 s, aby se příliš nesnižovala aktivita termostabilní polymerasy. Jednořetězcová DNA slouží v další fázi jako matrix pro syntézu nového komplementárního řetězce.



Obr.1 - Denaturace - tepelná separace řetězců [5]

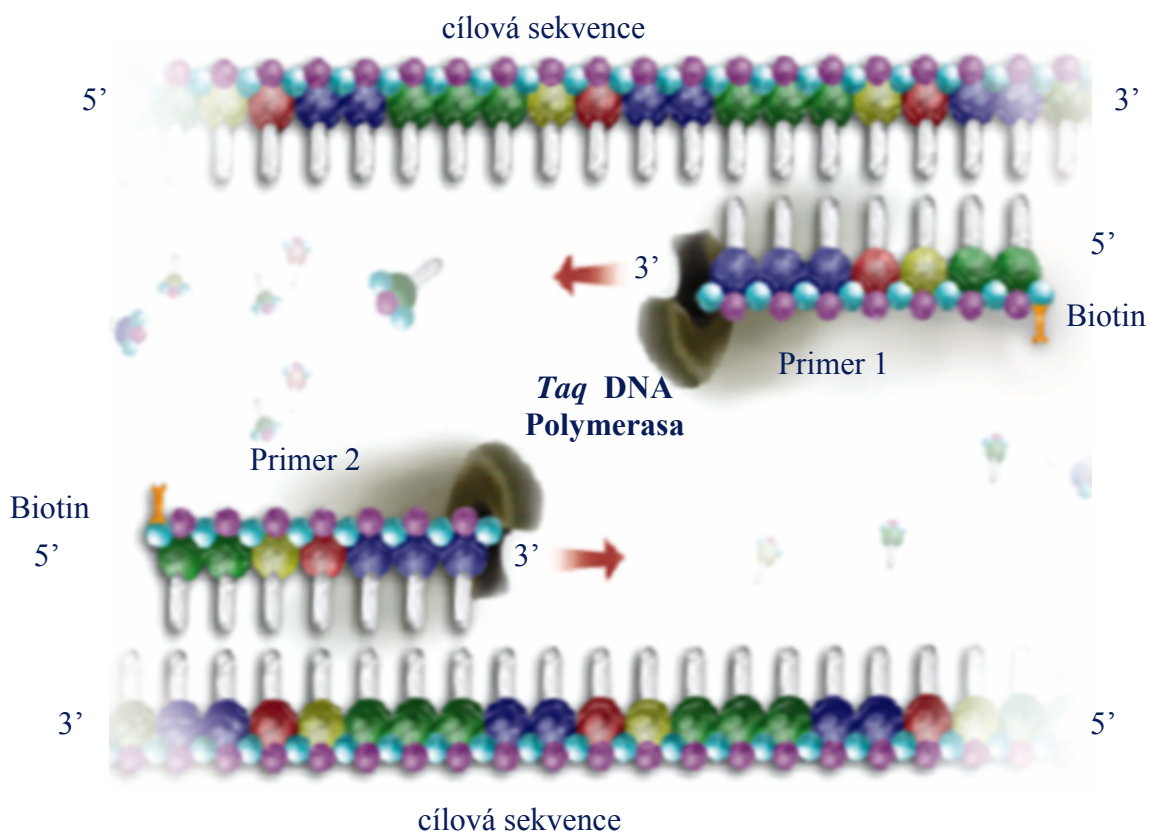
2. Nasednutí (annealing) syntetických primerů s jednořetězovým templátem - syntéza je enzymatickým procesem, jenž začíná nasednutím tzv. primeru (česky očka) na komplementární sekvenci matricového řetězce. Primery jsou syntetické oligonukleotidy (20 - 30 nukleotidů). Nasednutí oček probíhá obvykle při teplotě 50 - 60 °C. Syntéza začíná od jejich 3' konce na obou templátových řetězcích a trvá obvykle 30 - 60 s.



Obr. 2 - Nasednutí primerů na komplementární úseky cílové sekvence [5]

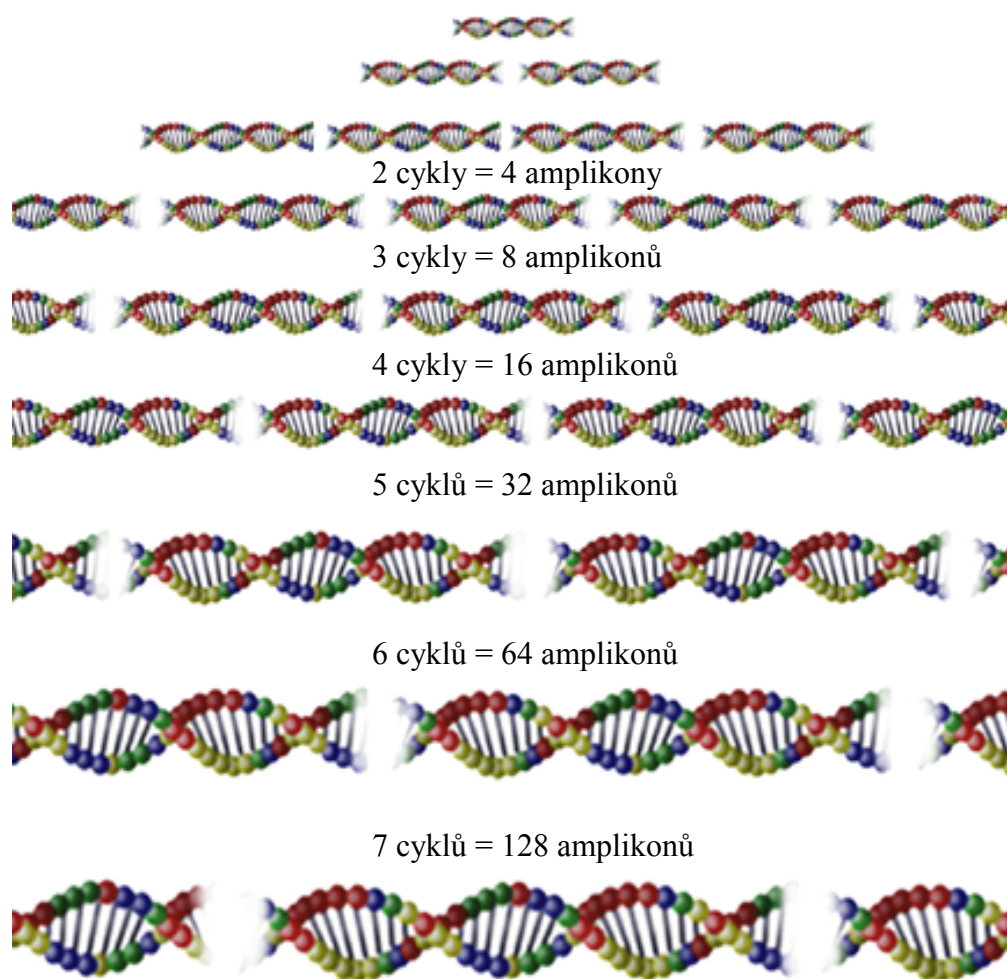
3. Extenze (elongace) primerů pomocí termostabilní DNA polymerasy - prodlužování primerů Taq DNA-polymerasou (izolovaná z termofilní bakterie *Thermus*

*aquaticus*), která je termostabilní. Optimální teplota této reakce je 72 °C a probíhá 30 - 60 s. V posledním cyklu se prodlužuje na 3 min (stabilizace). Prodlužování primerů probíhá ve směru 5'→ 3' na obou řetězcích, výsledkem procesu je novotvořený úsek dvouřetězcové DNA (dsDNA), tzv. **amplikon**. Protože se amplifikují oba řetězce matricové DNA zároveň, vzniknou z jedné výchozí molekuly dsDNA dva amplikony. Každý další cyklus počet amplikonů opět zdvojnásobí. Z jedné molekuly, která vstoupila do reakce, vznikne v průběhu 30 cyklů až 1 073 741 824 amplikonů. Ve skutečnosti je tento počet menší, neboť může docházet k chybám, Taq DNA-polymerasa nemá 3'→5' exonukleasovou aktivitu odpovědnou za odštěpení chybně párovaných nukleotidů. Riziko chyb je tím větší, čím delší je amplifikovaný úsek a čím vyšší je zastoupení C-G bází (spojené 3 H - můstky). Proto se doporučuje zvýšit počet cyklů na 35 - 40, nebo se používají rekombinantní termostabilní DNA-polymerasy s editační aktivitou, která dosahuje bezchybné amplifikace dlouhých segmentů.



Obr. 3 - Elongace, prodlužování řetězců od 3' konce primerů pomocí Taq DNA polymerasy [5]

4. PCR se ukončí ochlazením inkubační směsi na 4 °C. [6]



Obr. 4 - Exponenciální amplifikace cílové sekvence [5]

### 2.2.2. Reverzně transkripční PCR (RT - PCR)

Technika PCR může být použita u RNA - molekul pro průkaz virů, které mají pouze tuto NK. Izolovaná RNA musí být před vlastní amplifikací překopírována do cDNA. Při klasické RT-PCR se používají dva polymerační enzymy, reverzní transkriptasa a termostabilní DNA - polymerasa. Retrovirová reverzní transkriptasa, izolovaná z viru ptačí myeloblastózy nebo z viru myší leukózy Moloneyové je termolabilní, nesnáší teplotu nad 42 °C a účinnost reverzní transkripce *in vitro* je nízká. Kromě toho je k dispozici rTth

DNA - polymerasa izolovaná z bakterie *Thermus thermophilus*, která je termostabilní a při teplotě do 60 °C a vhodné koncentraci  $Mn^{2+}$  iontů funguje jako RNA dependentní DNA-polymerasa, při teplotě nad 70 °C a vhodné koncentraci  $Mg^{2+}$  iontů jako klasická DNA-polymerasa. Před začátkem DNA dependentní reakce je nutné odstranit  $Mn^{2+}$  ionty chelatačním činidlem a přidat potřebné množství  $Mg^{2+}$ . [7]

### 2.2.3. Nested PCR

Je velmi citlivá metoda, která se využívá při nízké výchozí koncentraci templátu, je to oblíbená modifikace PCR. Amplifikace probíhá dvoufázově, v obou fázích o cca 25 cyklech. V první fázi je pomocí jedné dvojice primerů (externí primery) namnožena delší sekvence nukleové kyseliny. Takto získané amplikony jsou přeneseny do jiné zkumavky, obsahující druhou dvojici primerů (tzv. "nested" primery), ty jsou specifické k vnitřnímu úseku amplikonů. Ve druhé fázi je amplifikována kratší vnitřní sekvence. Ve srovnání se standardní PCR se touto metodou dosahuje až 1 000 krát vyšší amplifikace cílové sekvence, což je pravděpodobně způsobeno snadnější denaturací kratších fragmentů DNA ve druhé fázi PCR. Citlivost nPCR se zvýší použitím radioaktivně značených primerů při druhé amplifikaci (hot nested PCR). Produkt amplifikace se separuje elektroforézou na polyakrylamidovém gelu a vizualizuje se autoradiografií. Tato modifikace se příliš nehodí pro rutinní provoz, protože otvírání zkumavek a přenos vzorků po první fázi zvyšuje riziko kontaminace. Proto se používají jiné modifikace nested PCR, kde se zkumavky otvírat nemusí.

Single-tube nested PCR používá podle různých autorů dvě modifikace. Buď oddělí ve zkumavce druhou dvojici primerů od reakční směsi pro 1. fázi reakce silnou vrstvou minerálního oleje. Po amplifikaci je obsah zkumavky promíchán a zcentrifugován v mikrocentrifuze. Nebo se používá tzv. diferenciální annealing vnitřního a vnějšího páru primerů. Konce primerů pro vnitřní amplifikaci (2. fáze) jsou upraveny tak, aby zde byla převaha C a G nukleotidů (3 vodíkové můstky) a tím je zvýšeno teplotní optimum pro annealing ve 2. fázi amplifikace. Touto technikou se dají zachytit velmi řídké sekvence (jedenkrát v miliónu buněk), je vhodná pro průkaz perzistujících virových infekcí nebo zjištění minimálního rezidua nádorové choroby. [7] [8]

#### 2.2.4. Asymetrická PCR

Touto metodou lze amplifikovat specifické fragmenty, lze namnožit jen jeden z řetězců DNA. Při vhodném asymetrickém poměru koncentrací syntetických primerů probíhá exponenciální amplifikace pouze v prvních 10-15 cyklech, a to do vyčerpání primeru v limitním množství. Následně se lineárně zvyšuje počet kopií vlákna vzniklého elongací primeru přítomného v přebytku. Odlišení řetězců umožňuje také biotinylovaný primer, který se použije pro syntézu jednoho z řetězců DNA. Řetězce s biotinem se specificky vážou na magnetické částice pokryté streptavidinem. Oddělení vláken se provede v magnetickém poli po denuraci vláken. Řetězce s magnetickými částicemi se shluknou na stěně zkumavky naléhající na magnet, ostatní sekvence zůstanou v roztoku. [8]

#### 2.2.5. TAS

TAS - Transcription-based Amplification System. Tato technika byla vyvinuta pro detekci RNA viru HIV-1. V první fázi se podle virové RNA syntetizuje komplementární řetězec DNA (za účasti reverzní transkriptázy). Ve druhé fázi pak templáty cDNA slouží pro transkripci do RNA pomocí RNA-polymerázy bakteriofága T7. Metoda je citlivá, nevýhodou byla nutnost tepelné denaturace duplexů RNA-DNA, přičemž termolabilní enzymy bylo nutno dodávat v každém cyklu. Pro rutinní využití bylo významné zjištění, že tepelná denaturace duplexů může být nahrazena enzymatickou aktivitou RNAsy H *E.coli*. [9]

#### 2.2.6. 3 SR

Self-Sustained Sequence Replication, je technikou odvozenou z TAS. Tato isothermická amplifikační technika napodobuje obecné schéma replikace retroviru a využívá simultánně aktivitu tří enzymů: RNAsu H (z *E.coli*), reverzní transkriptázu (z viru ptačí myeloblastózy) a T7 RNA polymerázu (z bakteriofága T7). Při optimalizaci teploty, pH, pufrů a po přidání složek, které zvyšují výtěžnost reakce, je tato technika co se týká výtěžnosti velmi efektivní ( $10^8$  během 30 minut). Je určena především pro amplifikaci



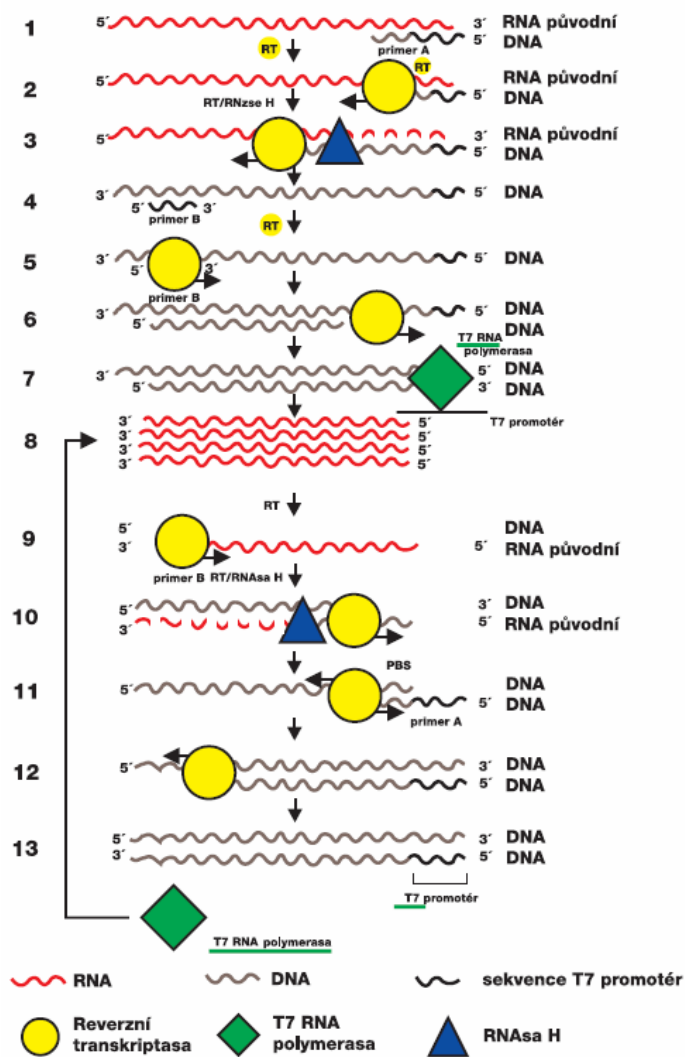
RNA. Nevyžaduje selektivní izolaci RNA, kdy může dojít působením aktivity RNAs k její degradaci a umožňuje selektivní amplifikaci RNA i v přítomnosti genomové DNA. A to proto, že přírodní dvouřetězová dsDNA je pro enzymatický systém 3SR nepřístupná. Použití této metody pro amplifikaci DNA není vyloučeno, vyžaduje však denaturaci dvouřetězové dsDNA na jednořetězovou ssDNA před začátkem amplifikace.

Princip reakce: po denaturaci je při 65 °C ke vzorku přidána směs všech tří enzymů, nukleotidy a dva syntetické oligonukleotidové primery. Vzorek je inkubován se směsí při 42°C ± 1°C. Primer A (15-30 párů bazí) je komplementární a specifický pro 3' konec cílové sekvence. Na jeho 5' konci je připojeno 25 párů bazí, které jsou rozeznávacím a iniciačním místem pro T7 RNA polymerázu. Primer B tvoří 15-30 párů bazí, které jsou specifické pro 5' konec cílové sekvence. Na 5' konci může být rovněž připojena rozpoznávací sekvence pro T7 RNA polymerázu. V 1. a 2. kroku se cílově specifická sekvence primeru A připojí k hledané RNA a prodlužuje se jako DNA působením reverzní transkriptázy. Vlákno RNA z tohoto komplexu je rychle degradováno působením RNAsy H (3. krok). Primer B je pak schopen se připojit ke 3' konci vznikající jednovláknové DNA a prodlužovat se působením reverzní transkriptázy (ta má rovněž aktivitu DNA-dependentní DNA polymerázy), což je 4. a 5. krok. Takto vzniká dvouvláknová DNA, která je rozpoznávacím místem pro T7 RNA polymerázu (6. krok). Amplifikace hledané cílové sekvence se začne uskutečňovat v 7. kroku, kde působením T7 RNA polymerázy vznikne 10 až 100 kopií RNA, komplementárních k hledané sekvenci RNA-DNA templátu (protismyslná RNA či antisense RNA). Primer B se napojí ke každé z těchto kopií RNA a prodlužuje se jako DNA působením reverzní transkriptázy (8. a 9. krok) a RNAsa H natráví RNA v tomto komplexu a primer A se připojí ke vzniklé jednovlákné DNA (10. a 11. krok). DNA - dependentní DNA polymerázová aktivita reverzní transkriptázy působí prodlužování primeru A a vlákna DNA obsahující primer B do plné délky, čímž vznikne opět dvouvláknová DNA obsahující rozeznávací sekvenci pro T7 RNA polymerázu a celý cyklus se opakuje až do vyčerpání zdrojů nebo do zastavení reakce např. inaktivací enzymů. [9] [10]

### 2.2.7. NASBA<sup>®</sup>

Tato metoda, Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, je principiálně totožná s technikou 3 SR. Je postupem firmy Organon Teknika Corporation chráněným ochrannou

známkou, má různé aplikace pro kvalitativní a kvantitativní stanovení. Amplifikace probíhá v termobloku při 42 °C, trvá 90 minut a detekce probíhá pomocí elektrochemiluminiscenční technologie. Homogenní detekční systémy nevyžadují izolaci produktu amplifikace a mohou probíhat v jedné zkumavce (omezení rizika kontaminace), je to rychlá a senzitivní technika vhodná pro kvantitativní i kvalitativní stanovení. U kvalitativních testů může být detekce prováděna tzv. semi-homogenní technikou založenou na specifické hybridizaci amplifikačního produktu se sondou značenou křenovou peroxidázou. Poté následuje separace hybridů a nenavázané sondy elektroforézou v polyarylamidovém gelu. Kvantitativní NASBA je založena na koamplifikaci nukleové kyseliny ze vzorku a interních kalibrátorů kdy jsou zajištěny identické podmínky pro izolaci i amplifikaci. Množství naamplifikované NK a tří interních kalibrátorů se změří pomocí elektrochemiluminiscence a množství NK se určí kalkulací na základě poměru ke kalibrátorům. [9] [10]



Obr.5 - Schéma reakce 3SR/NASBA [9]

- 1: Na specifickou sekvenci RNA (ze vzorku) nasedne komplementární primer, který má na 5' konci sekvenci, sloužící jako promotér T7.
- 2: Od 3' konce s pomocí reverzní transkriptasy začne syntéza řetězce cDNA.
- 3: RNAsa H destrukuje původní řetězec RNA a uvolňuje cDNA z duplexu.
- 6: V další fázi nasedá na specifický úsek cDNA primer od jehož 3' konce dochází za účasti transkriptasy k syntéze komplementárního řetězce. Vznikne dvouřetězová DNA, která obsahuje funkční promotér T7 RNA polymerasy.
- 7,8: Transkripčně kompetentní cDNA slouží v další fázi jako matrix pro masovou (50 až 1000 kopií) produkci antisense RNA (je transkriptem původní RNA).
- 9 až 13: RNA transkripty jsou okamžitě konvertovány do cDNA obsahující promotér T7 RNA polymerasy, jež slouží opět jako transkripční templáty. Tato fáze se cyklicky opakuje za izotermických podmínek do vyčerpání zdrojů nebo zastavení reakce.

### 2.2.8. TMA

Principem techniky Transcription Mediated Amplification (amplifikace řízená transkripcí) je amplifikace cílové sekvence RNA pomocí reverzní transkriptázy a DNA dependentní RNA-polymerázy. Cyklus probíhá za konstantní teploty ve dvou fázích.

V první se syntetizuje DNA komplementární k cílové molekule RNA a ve druhé se syntetizovaná dsDNA transkribuje. V tomto systému se používá dvou primerů, první tzv. promotor-primer, nese na 5' konci promotorovou sekvenci pro T7 RNA-polymerázu a na 3' konci sekvenci, která se váže na cílovou sekvenci RNA a je prodlužována reverzní transkriptázou. Druhý primer je komplementární k sekvenci na 3' konci nově syntetizovaného řetězce cDNA. Cílová molekula RNA slouží v první fázi jako templát, který se přepisuje reverzní transkriptázou za vzniku hybridní molekuly RNA - cDNA. Po degradaci RNA řetězce (RNAsou H) katalyzuje reversní transkriptáza polymeraci druhého řetězce cDNA. Ve druhé fázi je dvouřetězová DNA templátem pro syntézu řady molekul RNA, katalyzovaných T7 RNA-polymerázou. Tyto řetězce RNA jsou matricí pro reverzní transkriptázu a dochází k opakování cyklu. Celá reakce začíná rozrušením vnitřní sekundární struktury RNA při 95 °C a pak se přidají enzymy a reakce už probíhá izotermně při 42 °C. Reakce má velkou výtěžnost a produkt se prokazuje vhodnou sondou na základě chemiluminiscence. Tato technika je vhodná k rychlé diagnostice mikrobiálních infekcí (např. mykobakterií a chlamydií). [11]

### 2.2.9. SDA

Strain Displacement Amplification (amplifikace založená na přemístování řetězce) je nová amplifikační technika, která je založena na schopnosti DNA polymeráz zahájit syntézu DNA podle jednořetězového štěpu a nahradit tak úsek DNA vyštípnutý restriktivním enzymem. Působení restriktivních endonukleáz vymezuje specifickou cílovou sekvenci tzv. target. Za normálních okolností restriktázy tvoří zlomy v obou řetězcích DNA. Tím by ovšem nevznikla matrix pro novotvořený řetězec, technika totiž vyžaduje přerušování pouze jednoho DNA řetězce. Proto se modifikuje rekogniční sekvence druhého řetězce vestavbou pozměněného nukleotidu (deoxyadenosin-thio-fosfát). V místě modifikovaného nukleotidu nedochází ke štěpení a řetězec slouží jako templát pro syntézu nového vlákna DNA. Díky vlastnostem používaných DNA polymeráz je SDA vhodná pro

amplifikaci jen velmi krátkých úseků. Lze použít termolabilních i termostabilních DNA polymeráz. Tato izotermická amplifikační reakce má exponenciální průběh. [9] [11]

Výše popsané metody se týkají amplifikace nukleové kyseliny (tzv. Target Amplification). Rychlý rozvoj molekulární biologie přinesl objasnění struktury a variability infekčních agens. Zdokonalení in vitro diagnostických metod posunulo jejich citlivost do dříve prakticky nedosažitelných hodnot. Masového rozšíření v rutinní diagnostice se dočkaly PCR, TMA, NASBA. Ostatní metody měly svá úskalí - obtížnou automatizaci, nemožnost zařadit interní kontrolu amplifikace, širokou šedou zónu při detekci.

### **2.3. Metody využívající amplifikaci signálu**

Mezi metody, které se rozšířily, patří také technika, která využívá amplifikaci signálu bDNA.

#### **2.3.1. bDNA**

Branched DNA assay (= Multiple Sandwich Assay). Po izolaci a denuraci NK infekčního agens probíhá hybridizace. Nukleová kyselina (target NA) hybridizuje ve dvou specifických úsecích s dvojicí komplementárních záchytných hybridizačních sond (CP = Capture Probes), imobilizovaných (vázaných) v jamce polystyrenové mikrodestičky. Současně na jiné specifické úseky této NK hybridizují dvě další dvojice komplementárních sond, které mají na svém konci navázány extenze pro budoucí zakotvení větveného zesilovacího multimeru (tyto sondy se nazývají extendery). V další fázi dojde opět k hybridizaci a na extenze dvojice navázaných extenderů se ukotví nosič větveného zesilovacího multimeru (PA = PreAmplifier). Následuje další hybridizační krok, při němž se na PA navazuje větvený zesilovací multimer (VZM). Na větvené úseky VZM se následně hybridizují oligonukleotidy značené alkalickou fosfatázou (LP = Label Probes). Takto lze na každou molekulu zachycené nukleové kyseliny navázat až 3000 molekul enzymu. Nakonec se po přidání dioxetanového substrátu změří chemiluminiscence. Metoda je třístupňová, jednotlivé kroky probíhají simultánně. Je vhodná pro detekci infekčních agens, jejichž NK se vyznačují určitou sekvenční heterogenitou. Záchytné sondy i extendery jsou navazovány na každý řetězec NK ve dvojicích. Target NA je

zachycena i v případě, že chybí komplementarita bází v jednom z úseků, signál je slabší (je zachycen i při navázání jediného extenderu). Technika umožňuje poměrně přesnou kvantifikaci a hodí se pro monitorování účinků antivirové terapie u hepatitid B a C, infekcí HIV a CMV.

### **2.3.2. Compound Probes**

Jsou to složené sondy ze dvou funkčních komponent: primární sonda je komplementární k hledanému úseku NK, je delší. Ta obsahuje sekvence pro hybridizaci sekundárních sond. Sekundární sondy mohou tvořit košaté formace typu Christmas tree, nebo jednoduché cirkulární struktury. V obou případech jde o zesílení signálu, tato metoda má však vysoké detekční pozadí. [12]

## **2.4. Metody využívající amplifikaci hybridizační sondy**

### **2.4.1. LCR**

Při ligázové řetězové reakci (Ligase Chain Reaction) se na rozdíl od PCR používají dva páry syntetických oligonukleotidových primerů. Každý pár vymezuje na jednom z komplementárních řetězců analyzované DNA příslušnou cílovou oblast. Vzdálenost mezi primery bývá pouze několik nukleotidů dlouhá, což urychluje amplifikaci a snižuje četnost chyb při začleňování nukleotidů během cyklu. Reakční systém obsahuje: termostabilní Taq - DNA polymerasu a termostabilní Tth- DNA ligasu. Jeden cyklus LCR má čtyři dílčí reakce, které se jako u PCR mnohonásobně opakují.

Tepelná denaturace analyzované DNA ( 85-95 °C )

Hybridizace primerů ( 45-70 °C ) k cílovým oblastem denaturovaných řetězců DNA

Elongace primerů ( 75-80 °C ), dojde k doplnění mezery mezi párem primerů

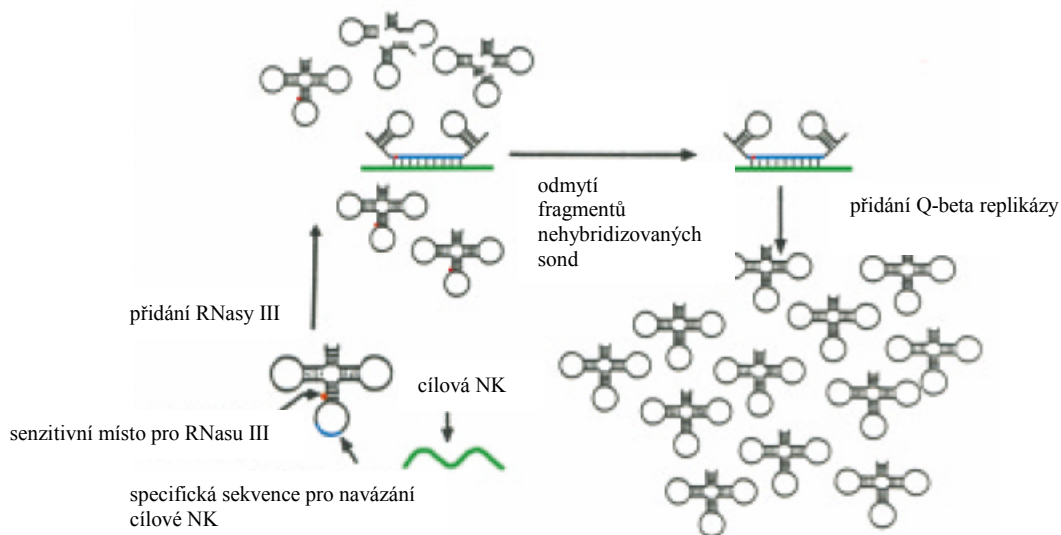
Ligace elongovaného primeru se sousedícím primerem

Amplikon se detekuje elektroforeticky nebo pomocí značené sondy. Metoda se v rutinní diagnostice infekčních onemocnění, již nepoužívá, neboť do ní nelze zabudovat vnitřní kontrolu amplifikace. [13]

### 2.4.2. Q-beta replikázová reakce

Používá enzym Q-beta replikázu, která replikuje genomovou RNA bakteriofága Q-beta. Tento proces je vysoce specifický, naprostá většina vzorků RNA jiných organismů v sekundární struktuře není pro enzym substrátem. Existence variability fágové RNA umožňuje tolerovat krátké inserce, jež mohou sloužit jako specifické hybridizační sondy, takto upravená RNA je enzymem replikována. Reakce probíhá v těchto krocích:

1. Izolovaná jednořetězová NK hybridizuje se specifickou sondou (krátká inserce vložená ve fágové RNA) jež obsahuje v intramolekulárně komplementárně spárovaném úseku místo pro působení RNasy III (degradační enzym). 2. Je přidána RNAsa III, začíná působit v místech senzitivních pro tento enzym. Hybridizované sondy mají tato místa pro endonukleázu nepřístupná, degradaci podléhají pouze nenavázané sondy, které jsou odmyty. 3. Je přidána Q-beta replikáza, ta při 37 °C zajistí replikaci hybridizovaných sond. Dojde tedy k selektivní amplifikaci těch sond, které hybridizovaly s komplementární cílovou strukturou NK izolované z infekčního agens. 4. Detekce nejvýhodnější jsou capture metody. Metodika je rychlá, ale příliš se nerozšířila. [12]



Obr. 6 - Schéma Q-beta replikázové reakce [12]

## **3. Detekce produktu PCR**

### **3.1. End-point PCR**

Nevýhodou tzv. end-point detekce produktu amplifikace je možnost vyhodnocení až po ukončení vlastní PCR reakce. Technika je pracná a existuje při ní nebezpečí kontaminace prostředí laboratoře při neopatrné manipulaci s amplikony. Nejdostupnější je elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu s fluorescenčními barvivy - ethidiumbromidem nebo např. SYBR Green (je citlivější a dražší) s následnou denzitometrickou detekcí. Je porovnávána koncentrace amplifikovaného vzorku s kalibrační křivkou standardu, který je amplifikován paralelně se vzorkem. Výhodou tohoto způsobu je finanční nenáročnost, je však méně přesný, časově náročný, umožňuje pouze orientační kvalitativní hodnocení a nelze jej automatizovat. Řádově citlivější je použití hybridizace se záchytnou nebo značenou specifickou sondou po ukončení PCR u konvenční reakce. Mezi end-point PCR zahrnujeme dva postupy.

#### **3.1.1. Komparativní Q-PCR**

Postup je označován též jako nekompetitivní. Porovnáváme koncentrace amplifikovaného vzorku s kalibrační křivkou standardu, který je amplifikován současně se vzorkem a může, avšak nemusí mít stejné primery.

#### **3.1.2. Kompetitivní Q-PCR**

Je založena na společné amplifikaci cílové sekvence pozitivního vzorku a vnitřního standardu o známé koncentraci (nejčastěji linearizovaný plazmid). Pro vzorek i standard se používají stejné primery, čímž je zajištěna stejná amplifikační účinnost PCR. Při PCR pak dochází ke kompetici (soutěžení) o všechny složky reakční směsi. Připravený vnitřní standard musí být amplifikován stejnými primery a měl by mít podobné procentuální zastoupení guanidinu a cytosinu jako má cílová sekvence vzorku. Od vzorku musí být dobře odlišitelný. Detekce cílové sekvence i interního standardu po amplifikaci je na principu ELISA a hodnotí se na základě kalibrační křivky.

Výhodou obou postupů je odhalení případné inhibice PCR a tím falešné negativity. Pokud zaznamenáme negativní signál jak u vyšetřovaného vzorku tak u standardu, jde o



inhibici. Nevýhodou je úzké dynamické rozpětí testů, vysoce pozitivní vzorky je nutno předředit, což vnáší do kvantitativní metody další nepřesnosti. [14]

### **3.2. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase**

Skutečným vývojovým průlomem je zavedení techniky PCR v reálném čase: real-time PCR. Poznatky, které k ní položily základ, byly získány v letech 1991-1992, kdy Higuchi a spol. vytvořili systém, s jehož pomocí bylo možné zaznamenat produkty PCR bezprostředně po jejich vzniku, po každém jednotlivém cyklu PCR. Je založena na kombinaci PCR amplifikace se současnou fluorescenční detekcí množství vzniklých amplikonů v každém cyklu polymerázové řetězové reakce. Tato technika umožňuje detekci PCR amplifikace již v počátečních fázích reakce a zároveň může v daném čase kvantifikovat relativně malé množství PCR produktu. Každý jednotlivý cyklus má shodné vlastnosti jako klasická PCR tj. denaturace dvouřetězové DNA, nasednutí primerů, extenze řetězce pomocí Taq DNA polymerasy. Při anelaci ovšem nasednou nejen příslušné primery, ale i sondy (specifické oligonukleotidové sekvence DNA) s fluorofory.

S přibývajícím počtem vzniklých amplikonů (přibývají s každým cyklem PCR) narůstá i vznikající fluorescence, což se projeví vzestupem fluorescenčních křivek. Pokud vstupní templátová DNA nebude přítomna, nedojde k její amplifikaci během PCR, nedojde k navázání fluorescenčních sond ani k emisi fluorescenčního záření a nárůstu fluorescence. Měření bude negativní.

Současně platí, že čím více je vstupní templátové DNA, tím dříve dojde k nárůstu fluorescenčních křivek nad pozadí, tento okamžik se nazývá bodem průsečíku "crossing point". Je to bod, kdy je amplifikovaný produkt poprvé "viditelný". Při nízkém počtu kopií DNA je třeba více amplifikačních cyklů, aby byl tento okamžik zachycen. [15] Jako fluorofor (barvivo, které po ozáření UV fluoreskuje) byl v roce 1991 použit ethidiumbromid, dnes se pro malou citlivost a specifitu nepoužívá. V současné době jsou pro kvantifikaci využívána jiná interkalační barviva např. SYBR-zeleň. Nevýhodou těchto barviv je, že nerozlišují případnou kontaminaci nespecifickou dsDNA a mohou zvyšovat pozadí interkalací barvičky mezi dimery primerů.

Selektivita detekce je zajištěna specifickými sondami. Využívá se interakce dvojice fluoroforů, které jsou vázány na 5' a 3' konci oligonukleotidové sondy (většinou 20-30

nukleotidů). Jeden z nich, na 5' konci sondy má funkci zářiče (reporter- R), druhý, na 3' konci sondy, má funkci zhášedce (quencher- Q). U sondy v intaktním stavu zhášedce tlumí záření emitované zářičem procesem tzv. Foerstrova rezonančního přenosu energie (FRET- Fluorescence Resonance Energy Transfer). Po vazbě sondy ke komplementárnímu úseku jednořetězové NK dojde k odštěpení nebo oddálení zhášedce a zářiče, který se vymanil z jeho tlumivého vlivu, emituje fluorescenci. Toto záření je zaznamenáno analyzátozem, s každou nově vytvořenou molekulou amplikonu narůstá jeho intenzita. Z narůstající intenzity záření je možno určit koncentraci vzorku. [14]

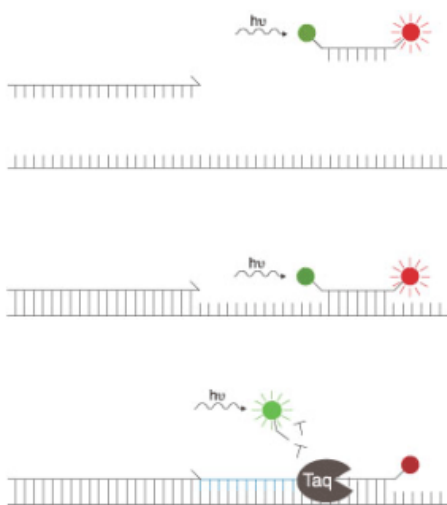
### 3.2.1. Sonda TaqMan®

Tyto sondy byly chemicky připraveny v roce 1991, do praxe byly zavedeny v závislosti na rozvoji instrumentária od roku 2002. Jejich princip je založen na využití 3' exonukleasové aktivity polymerázy.

V 1. fázi dochází k tepelné denaturaci DNA, jež poté nasedne na cílový úsek (target) primer a současně s ním specifická TaqMan sonda. Amplifikované úseky jsou navrhovány tak, aby TaqMAN sonda nasedla před konec amplifikovaného úseku. Při annealingu při určité teplotě nasedá jak primer, tak i sonda. Sonda má tvar vidličky, což při její malé délce, kdy má navázány luminifory na 3' i 5' konec sondy, znamená, že oba luminifory jsou tak blízko sebe, že je umožněn rezonanční transfer fluorescenční energie. Na 5' konci je navázán vhodný fluorofor (reporter) s krátkou vlnovou délkou emitovaného záření, na 3' konci pak tlumič (quencher) s delší vlnovou délkou záření. Excitovaný fluorofor by za normálních okolností emitoval záření určité vlnové délky, které by bylo registrováno fotočlánkem. Vzhledem k tomu, že v jeho blízkosti je druhý fluorofor pohlcující toto jeho záření a emitující svoje záření jiné vlnové délky, tak v klidovém stavu nenavázané i navázané sondy není fluorescence očekávané vlnové délky registrována. Pokud dojde při teplotě 72 °C k polymeraci řetězce a je elongován až k místu, kde je navázaná sonda, projeví se exonukleasová aktivita enzymu. Při rozpadu sondy dojde k oddělení nukleotidů s navázaným fluoroforem, ten se vymaní z vlivu svého tlumiče. Rezonanční transfer fluorescenční energie přestane existovat a fluorofor emituje fluorescenční záření krátké vlnové délky, které je registrováno jako očekávaný signál. Takto je registrován každý nově vytvořený řetězec. Záření tlumiče (delší vlnové délky)

ustane. Protože v rámci amplifikace dochází k degradaci hybridizačních sond, nelze provádět analýzu křivky tání.

Real-time PCR má několik postupů, všechny umožňují přesnou kvantifikaci produktů. Protože má spojenou amplifikaci a detekci v jednom kroku, je velmi úsporný z hlediska časového (1 hodina), to je umožněno díky existenci vícekanálových cyclerů (až 6 kanálů). Je možné registrovat současně 6 různých vlnových délek (530, 570, 610, 640, 670, 705 nm), což umožňuje i multiplexní eseje. Je možno hledat současně několik infekčních agens.



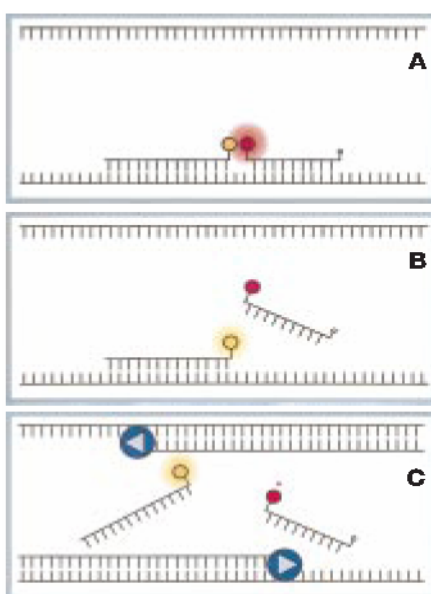
Obr. 7 - TaqMan sonda [35]

### 3.2.2. FRET - sondy

Fluorescence Resonance Energy Transfer, má sondy používané ve dvojici, každá z nich je komplementární k určitému úseku DNA. Tyto sondy nasednou vedle sebe s mezerou cca 10 nukleotidů, aby konce obou sond byly v kontaktu, ale nikoli bezprostředním (podobné jako u ligázové reakce). Jedna sonda je značena na 3' konci fluoroforem (emitor), druhá na 5' konci je tlumič. První sonda (emitor) po excitaci svítí, když je volná, druhá sonda nesvítí. Když sondy sednou k sobě, tak první sonda s fluoroforem zhasne a rozsvítí se druhá sonda, protože pohltí její energii (obr.A). Pokud hybridy tvořené každou z obou sond mají rozdílnou teplotu tání  $T_m$ , tak při postupně stoupající teplotě se jedna z nich oddělí dřív a FRET se přeruší. Akceptor energie zhasne a donor se naopak rozsvítí, objeví se signál (obr.B). Toho se využívá tam, kde potřebujeme

rozlišit dva různé typy infekčního agens. Herpes virus - typ 1, tam nasednou plně obě sondy (25 nukleotidů). Herpes virus - typ 2, určité sekvence u viru chybí a proto první sonda nesoucí emitor nasedne s vytvořením smyčky. Vazba je méně pevná (15 nukleotidů). Když se bude postupně zvyšovat teplota, tak v případě typu 2 se vazby uvolní při nižší teplotě (mají nižší teplotu tání) než u typu 1, signál se u typu 2 objeví dříve. Totéž se stane, když je jedna ze sond oddělí v důsledku exonukleasové aktivity Taq polymerasy při elongaci novotvořeného řetězce (obr.C).

Použité barvivo je v určité konfiguraci, která brání rozsvícení sondy, v momentě kdy sonda nasedne na příslušný nově utvořený řetězec tak se uvolní. [16]



Obr. 8 - Hybridizační Fret-sondy [16]

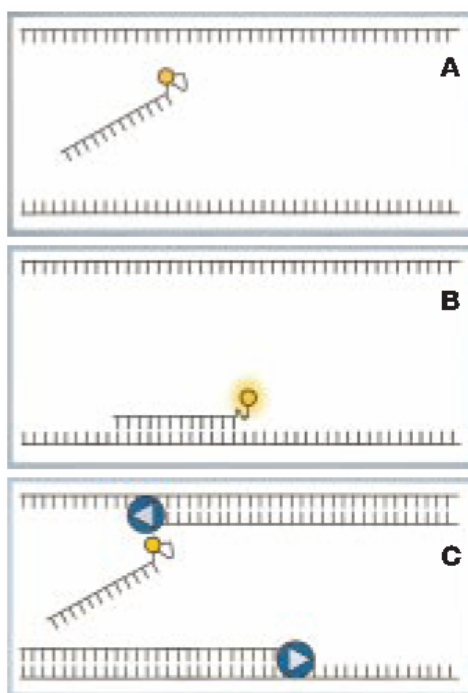
### 3.2.3. Molecular Beacons

Molecular Beacons (molekulární majáčky) využívá sond, které vypadají jako jednořetězová smyčka RNA, v této smyčce je úsek komplementární k hledané cílové oblasti vyšetřované NK. Dále mají dvouřetězový kmen spojující komplementární nukleotidy vodíkovými můstky. Na konci kmene jsou fluorofory, mezi nimiž dochází k rezonančnímu přenosu fluorescenční energie. V klidovém stavu je fluorofor tlumen tlumičem, sdílejí spolu přechodně elektrony, fluorescence je eliminována a sonda nesvítí. V této konfiguraci sonda plave v roztoku, dokud se neobjeví jednořetězová nukleová kyselina komplementární ke smyčce sondy. Potom dojde k hybridizaci, sonda nasedne a dojde k rozvolnění vodíkových můstků na kmene. Tím dojde k oddálení obou fluoroforů, ty se přestanou navzájem tlumit a sonda vyše signál. Sondy, které jsou přidány do reakční

směsí se postupně navazují na vznikající amplikony a umožňují v reálném čase jejich detekci. Sonden jsou tvořeny tak, aby dvouřetězový kmen byl méně stabilní než helix tvořený smyčkou sondy a vyšetřovanou nukleovou kyselinou. Vysoká specifita této detekce vychází z toho, že rozdíl v komplementaritě jediného nukleotidu (bodová mutace) způsobí zachování stability kmene a k záření nedojde. Pomocí těchto sond se kvantifikuje NASBA. Použití fluoroforů různých barev se uplatňuje v multiplexních testech. [16]

### 3.2.4. SimpleProbes<sup>TM</sup>

Tyto sondy jsou značené fluoroforem a záření emitují po nasednutí na komplementární sekvenci NK (obr. B). Po uvolnění z hybridu (obr C), nebo pokud jsou volné v roztoku (obr A), záření nevysílají. Pokud je  $T_m$  sond nižší, než teplota nasednutí primerů je zajištěno, že při probíhající PCR detekční sondy neinterferují. [16] Tato sonda je volná v takové konfiguraci, která zabraňuje emisi záření.



Obr. 9 - SimpleProbe<sup>TM</sup> [16]

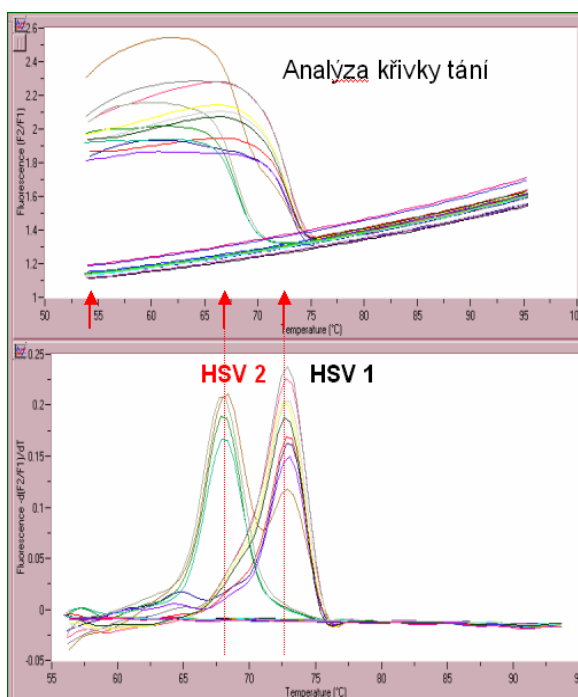
### 3.2.5. Sonda Scorpions<sup>TM</sup>

Jsou vysoce senzitivní a specifické, u nás se příliš nepoužívají. Jsou k dispozici ve dvou variantách : Uni-probes ve tvaru vlásenky (30 až 60 nukleotidů) a Bi-probes v duplexním formátu ( 15 až 45 nukleotidů). [16]

### 3.3. Identifikace produktů PCR analýzou křivky tání

Metoda využívá skutečnosti, že každá molekula DNA má charakteristickou teplotu tání ( $T_m$ ) pomocí níž je identifikována. Je to teplota, při níž se oddělí 50% párů bazí. Teplota tání je závislá na délce řetězce, čím je kratší řetězec, tím je nižší teplota. Je závislá na zastoupení párů bazí adenin-tymin a cytosin-guanin. A-T je spojen jen 2 vodíkovými můstky a C-G 3 vodíkovými můstky. Proto čím je méně bazí cytosin a guanin, tím je nižší  $T_m$ . Tímto způsobem jsme schopni rozlišit specifické produkty od produktů vedlejších nebo od dimerů primerů (tyto produkty zesilují fluorescence).

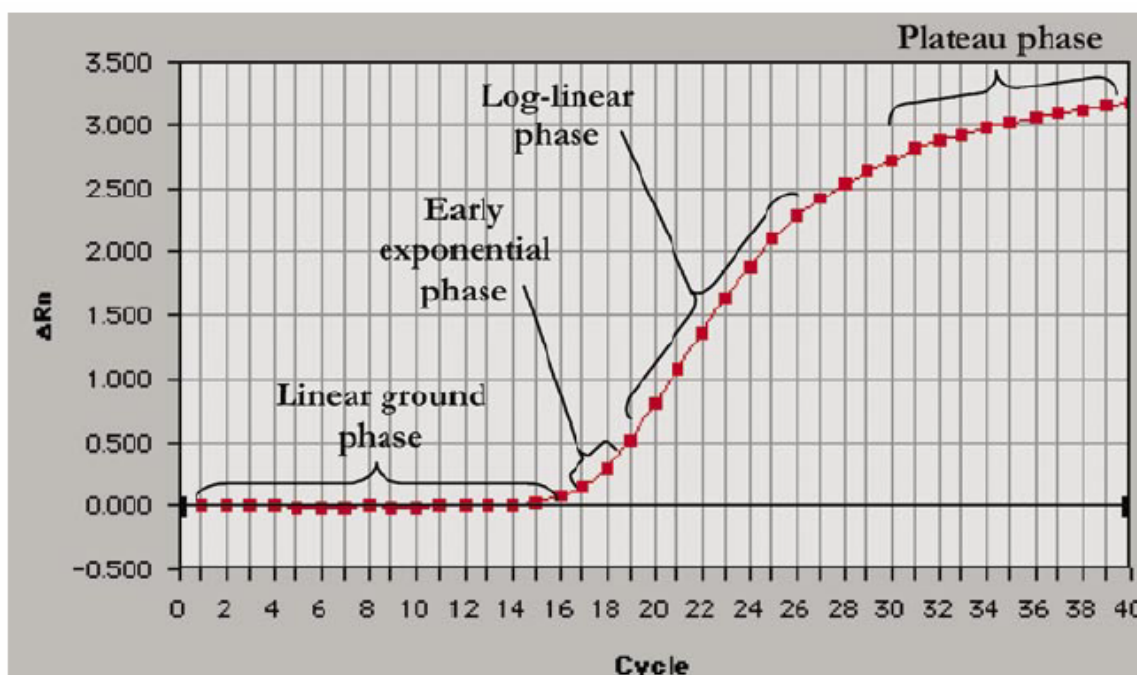
$T_m$  je závislá na stupni komplementarity bazí, každé 1% chybně spárovaných bazí sníží teplotu tání o 1 - 1,5 °C. Toho se využívá k detekci mutací, genotypizaci a rozlišení typu infekčního agens, které se liší v některých sekvencích, v počtu nukleotidů. Jak mám uvedeno v části 3.2.2. rozlišení Herpes virus typ 1 a 2, kdy se jejich teplotní stabilita díky odlišné sekvenci liší. Labilnější je vazba sondy k produktu amplifikace HSV 2, odtaje při teplotě cca 67 °C a to vede k náhlému poklesu intenzity fluorescence (přerušuje se FRET efekt mezi donorem a akceptorem). Sondy u HSV 1 se oddělí při teplotě o 6 °C vyšší, což bezpečně odliší oba subtypy. [17]



Obr. 10 - Analýza křivky tání [36]

### 3.4. Fáze PCR reakce

PCR proces prochází čtyřmi fázemi. První fáze je tzv. Linear ground phase; reakce je v počátku a fluorescenční emise nepřekročí hraniční hodnoty (je to prvních 10-15 cyklů). V druhé, Early exponential phase (časná exponenciální fáze), intenzita fluorescence dosáhne kritické hranice a dál se výrazně zvyšuje (určení "crossing point"). Během třetí fáze Long-linear phase nastanou ideální podmínky pro optimální amplifikaci se zdojnásobením PCR produktu v každém cyklu. Při poslední - The Plateau phase se limitují reakční komponenty a fluorescenční intenzita již není vhodná pro zpracování dat. Dynamika PCR amplifikace připomíná růstovou křivku bakterií. Při optimálně účinné amplifikaci se může vzorek s menším množstvím NK infekčního agens dostat ve fázi plateau na stejnou úroveň jako vzorek s větším vstupním množstvím NK. [18]



Obr. 11 - Křivka fází reakce PCR [18]

### 3.5. Shrnutí detekce real-time PCR

Je kombinací PCR amplifikace se současnou fluorescenční detekcí vznikajících amplikonů v každém cyklu PCR. Detekce se provádí sekvenčně specifickou sondou (přehled sond je uveden v část 3.2.), nebo s využitím interkalačních barviv např SYBR

Green, které fluoreskují v důsledku konformačních změn molekuly po vazbě na dsDNA. Při tom dochází k značnému zvýšení fluorescence. Intenzita signálu je úměrná množství produktu. Při interpretaci pomocí barviv může dojít k detekci jakékoliv dsDNA přítomné ve směsi, což zvyšuje fluorescenci. Nebo může dojít k tvorbě nespecifických PCR produktů nebo dimerů primerů, produkt by měl být proto identifikován pomocí křivky tání.

S přibývajícím počtem vzniklých amplikonů (s každým cyklem PCR) narůstá fluorescence, což se projeví vzestupem fluorescenčních křivek. Čím je více vstupní templátové DNA, tím dříve a při nižším počtu cyklů PCR dojde k vzestupu fluorescenčních křivek nad pozadí. Tento okamžik je nazýván  $C_p$  crossing point a je vyjádřen počtem cyklů. Je to bod, kdy je amplifikovaný produkt poprvé viditelný.

Důvodem pro vyšší dynamický rozsah měření při použití real - time PCR je měření v době lineárního nárůstu fluorescence, kdy je účinnost amplifikace konstantní. U vzorků o odlišné vstupní koncentraci nemusí být při end-point analýze tento fakt (odlišná vstupní koncentrace) vůbec zjištěn. Důvodem je, že počet amplikonů se po celou dobu PCR nezvyšuje geometricky. Účinnost PCR není po celou dobu konstantní, ale mění se s počtem cyklů. Klesá s narůstajícím počtem cyklů. Je to způsobeno řadou faktorů, např. vysycováním reagensů, teplotní nestabilitou polymerasy. Pro kvantifikaci je nutno volit tu část PCR, kdy je účinnost konstantní. [15]

### **3.6. Kvantifikace a standardy**

Kvantifikace relativní - koncentrace je udána jako poměr množství specifického produktu k referenčnímu genu. Kvantifikace absolutní - neznámou koncentraci vstupní NK je třeba porovnat se známým počtem kopií standardů. Při této kvantifikaci je porovnáván  $C_p$  vzorku s  $C_p$  jednotlivých standardů. Vynesením  $C_p$  standardů v závislosti na log jejich známých koncentrací je získána standardní křivka, ze které pomocí naměřeného  $C_p$  u neznámého vzorku software přístroje odečte měřenou neznámou koncentraci. Standardy pro kvantifikaci se musí amplifikovat se shodnou účinností a za stejných podmínek jako neznámý vzorek. [15]



## 4. Příprava vzorku

### 4.1. Manuální

Přetrvávajícím problémem je riziko ztrát nebo znehodnocení nukleových kyselin při preamplifikačním zpracování vzorku. V současnosti se používají tyto způsoby: filtrační - NK je z lyzačního roztoku zachycována na mikrofiltru a pak je vymyta; precipitační - hlavně při izolaci RNA, kyselina je z lyzačního roztoku vysrážena isopropanolem, který je následně vymyt etanolem a neutralizován působením proteinkinasy K za horka. Manuální postupy jsou všechny s rizikem ztrát materiálu.

### 4.2. Automatizovaná izolace

Systém přípravy vzorku AMPLIPREP<sup>TM</sup> byl vyvinut v letech 1997 až 1998 k analyzátoru COBAS Amplicor, dá se však použít i u dalších systémů. Příprava vzorku je založena na zachytu jednořetězové NK z lyzačního roztoku pomocí biotinylované hybridizační sondy a dá se použít pro zpracování plné krve, plasmy, séra a mozkomíšního moku. Vzorek se přenese v maximálním množství 750  $\mu$ l do zkumavky s lyzačním roztokem. Lýza buněk probíhá při 60 °C po uvolnění NK a denuraci dsDNA se přidá komplementární biotinylovaná sonda. Hybridizace probíhá opět při 60 °C. Po ukončení hybridizace se přidá suspenze mikropartikulí s kovovým jádrem, na něž je vázán streptavidin, s jehož pomocí jsou zachyceny hybridizované sondy. Při následném promývacím procesu elektromagnet fixuje mikropartikule u dna zkumavky a všechny balast a příp. inhibitory polymerasy jsou odsáty. Potom se přidá do zkumavky diluční roztok (75-250  $\mu$ l) a tepelnou denurací se rozvolní H-můstky. Jednořetězová NK je až 10x koncentrovaná v čisté zkumavce se použije pro amplifikaci. Systém je zabezpečen proti kontaminaci. Zkumavky jsou na vstupu i výstupu uzavřeny na závit, celý proces probíhá v plastovém kontejneru na jedno použití, v němž je veškerý použitý materiál uzavřen. Vzorek se dostává pouze do špičky mikropipety opatřené filtrem, dávkovací jehla na reagentie je mezi jednotlivými dávkami promývána. Prostor automatu je ozařován UV zářičem. Zpracování vzorku trvá 50 minut a kapacita je 24 až 30 vzorků za hodinu. Reagentie a zkumavky lze vkládat i během chodu přístroje. [19]

Genom-48 Robotic Workstation - pracovní postup je obdobný, systém uzavřený, automatický, používá UV záření pro sterilizaci pracovního prostředí. Extrahují se nebo

purifikují NK ze 6 vzorků současně, v jedné sérii může být až 48 vzorků. Principem je vazba nukleové kyseliny na skleněný povrch paramagnetické kuličky v přítomnosti chaotropních iontů v roztoku (např. jodid sodný, guanidium thiokyanát). Po promytí zůstanou NK navázané na skleněné kuličky. Následně jsou tyto kyseliny uvolněny z kuliček přidáním elučního činidla (vody). Lze získat genomickou DNA z krve, buněk a tkání, plazmidovou DNA, celkovou, virovou RNA a mRNA, případně přečistit produkty PCR. [20]



Obr. 12 - Genom-48 Robotic Workstation [20]

MagNA Pure Compact System - se používá na našem oddělení. Je určen pro izolaci DNA, RNA nebo virových NK z krve, séra, plazmy, kultury buněk, příp. z jiných materiálů. Princip je stejný jako u předchozích systémů, jde o izolaci pomocí magnetických kuliček. Současně lze izolovat 1-8 vzorků a doba izolace je 20 až 40 minut. Systém eliminuje nebezpečí kontaminace. Izolační set obsahuje reagensy naplněné kazety překryté hliníkovou fólií, eluční zkumavky a sadu špiček pro jednu izolaci včetně děrovacího hrotu na protržení fólie. Přístroj obsahuje HEPA filtr a UV lampu pro dekontaminaci. Je automatizován, používá čárové kódy a umožňuje zařazení interní kontroly amplifikace do izolačního procesu. [21]



Obr.13 - MagNa Pure Compact System [37]

## 5. Systémy pro rutinní diagnostiku

### 5.1. COBAS® Amplicor™ System

Jedná se o automatický, plně programovatelný analyzátor schopný provést amplifikaci a detekci biotinylovaného produktu pomocí specifické hybridizační záchytné sondy. Přístroj se skládá ze dvou nezávisle programovatelných termocyklérů, dvou odkladových čekacích pozic na detekci, třepačky na 12 specifických reagenčních kazet (obsahujících záchytné hybridizační sondy, detekční reagentie a zásobníky s detekčními zkumavkami), dále má suchý kontaktní termostat, promývačku zkumavek, optický denzitometr, ovládací panel a pohyblivé rameno s jehlou na přenášení vzorků a mechanickou ruku na přenášení zkumavek. Nezávislé programování obou cyklérů umožňuje optimální využití systému i v malých laboratořích. Jeho výhodou je variabilita a rychlost zpracování. [32]



Obr. 14 - COBAS® Amplicor™ [38]

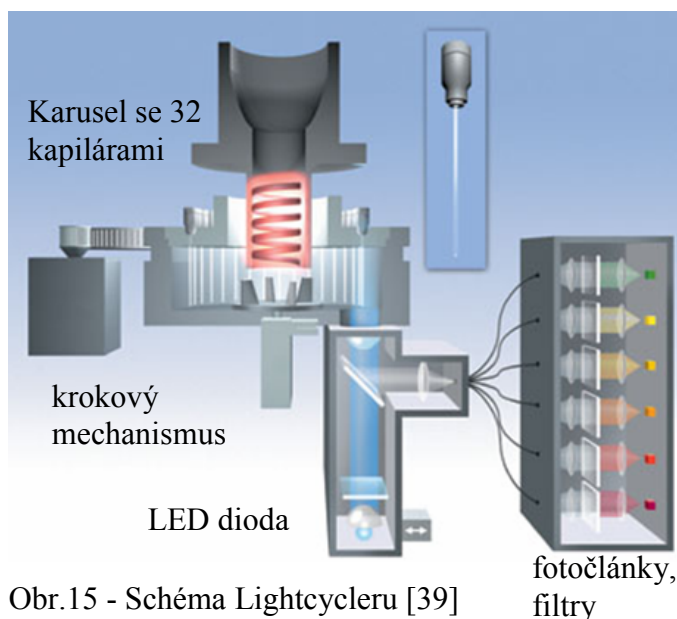
## 5.2. LightCycler™ System

Systém se ideálně hodí pro kinetickou PCR. Změny teplot v rámci amplifikace se dosáhne mícháním horkého vzduchu ohřátého tepelným zdrojem a vzduchu pokojové teploty zvenčí. Regulační soustava teplotních senzorů zajišťuje teplotu s přesností  $\pm 0.3$  °C a teplotní změny probíhají rychlostí 20 °C za sekundu. Amplifikační kapiláry z borosilikátového skla se umísťují do karuselu pro 32 kapilár. Krokový posun umožňuje přesun kapiláry z amplifikační komory na detekční pozici bezprostředně po ukončení amplifikačního cyklu. LED dioda v měřicím kanálu osvětí kapiláru modrým světlem vlnové délky 470 nm a excituje fluorescenční barvivo reporteru. Toto záření je vedeno do měřicích kanálů přes filtry a zrcadla. Otočení celého karuselu včetně změření kapilár trvá 5 sekund. Měření fluorescenčního záření u jedné kapiláry činí 20 milisekund. Toto zařízení má dosud nejuniverzálnější použití. [19]

Oba systémy jsou používány na našem pracovišti.

Systém regulace  
ohřevu

Amplifikační kapilára  
na 20 ul vzorku



Obr.15 - Schéma Lightcycleru [39]



Obr.16 - Lightcycler [40]

## 6. Real-time PCR v diagnostice infekční nemoci

Klasická PCR má oproti mnoha výhodám, jako je vysoká specifita a citlivost, jeden zásadní nedostatek. Na konci reakce nekoreluje množství PCR produktu s počtem terčových sekvencí ve vzorku a to díky tzv. plateau efektu. Devadesátá léta 20. století přinášejí v oblasti molekulární biologie nové technologie pro kvantitativní analýzu. Pomocí nových technik a detekčních sond jak už uvádím v předchozím textu. Významným omezením je však jejich jistá roztržitost: jsou založeny na velmi odlišných principech, často jsou obtížně proveditelné, málo robustní, mají malý dynamický rozsah měření a často nelze porovnávat výsledky dosažené v jednotlivých laboratořích. Jaká je tedy "ideální" metoda pro běžnou diagnostiku? Měla by mít vysokou citlivost (nízký detekční limit) a široký dynamický rozsah měření, být flexibilní (analýza NK různého původu a odlišné koncentrace musí být amplifikovány se stejnou účinností), poskytovat reprodukovatelné výsledky, být vhodná pro rutinní aplikace a umožnit absolutní kvantifikaci počtu kopií. V podstatě tyto požadavky splňuje real-time PCR (možnost monitorování v libovolném okamžiku reakce, detekční sondy s fluorescenčním signálem a nové algoritmy pro výpočet množství terčových molekul). [21]

### 6.1. Využití PCR ve virologii

Systemová virová aktivita se skládá z řady dynamických procesů zahrnujících infekci cílových buněk, uvolnění virionů mimo buňky, eventuálně mimo krevní kompartmenty. Studie využívající qPCR zjistily, že změny hodnot virové nálože během různých fází infekce mohou být účinně vyhodnocovány měřením virů v plasmě, a že podstatné zvýšení virové nálože odpovídá progresi onemocnění. Nemusí to však platit vždy, u řady virových infekcí neodráží množství virových genomů v krvi aktuální aktivitu probíhající v cílové tkáni nebo orgánu. Např. u infekce virem HIV1 hodnoty v plasmě korelují s hodnotami v mízních uzlinách, ale u infekce virem HCV hodnoty v plasmě nekorelují s hodnotami aktivity viru v jaterní tkáni. Z toho plyne, že je třeba znát korelaci mezi virovou aktivitou v plasmě a cílových buňkách a podle toho volit vyšetřovaný materiál. qPCR má velký význam i pro antivirovou léčbu. Např. monitorování antivirové terapie může pomáhat k pochopení patogeneze virové hepatitidy C. Hladiny viru jsou

stabilnější u asymptomatických nosičů než u pacientů s biochemicky aktivním jaterním onemocněním. [22]

### 6.1.1. Virové hepatitidy

V polovině 70. let byly zavedeny do praxe diagnostické testy pro průkaz HAV a HBV. Brzy se však ukázalo, že řada hepatitid má jinou etiologii. Tyto hepatitidy byly označeny non-A a non-B a tvořily 90-95% tzv. případů potransfuzních hepatitid

HCV je obalený RNA virus s jednořetězovou pozitivně orientovanou RNA. Jeho genom obsahuje asi 10 000 nukleotidů. Infekce se šíří hlavně parenterální cestou, sexuální nebo vertikální přenos z matky na dítě je možný, ale méně častý. Prevalence infekce virem HCV je vysoká u pacientů, kteří jsou příjemci transplantovaných orgánů, krevní transfuze nebo komerčních srážecích faktorů a u osob s nitrožilní aplikací drog. Zvýšenému nebezpečí infekce, které může být omezeno vhodným režimem, jsou vystaveni nemocní při hemodialýze a zdravotnický personál.

Patogeneze hepatitidy C není dosud zcela objasněna. HCV se množí v hepatocytech a v mononukleárech. Množení viru v játrech je provázeno zánětem a nekrózou buněk. Tyto projevy jsou spíše důsledkem uplatnění imunopatologických mechanismů obrany než cytopatickým účinkem viru a předpokládá se i účast autoimunních reakcí. Při replikaci viru vzniká mnoho defektních částic, virus má velký denní obrat virionů a vysokou mutační frekvenci. Organismus není schopen tyto částice neutralizovat existujícími protilátkami a proto až 80% infekcí vede k rozvoji chronické formy onemocnění s častým vyústěním do jaterní cirhózy s vysokým rizikem vzniku hepatocelulárního karcinomu.

Hlavními prostředky terapie jsou v současné době pegylovaný interferon alfa a virostatikum ribavirin. Na dlouhodobou aplikaci interferonu alfa odpovídá vymizením známek infekce 50% nemocných. U poloviny těchto pacientů po vysazení léčby dochází k relapsu choroby a pouze u 25% chronicky nemocných je trvalý léčebný efekt. U různých genotypů HCV je různá odpověď na terapii a různě těžký průběh onemocnění. Proto je velmi důležité stanovení genotypu viru, sledování kinetiky virémie a kvantifikace virové nálože. To jsou důležité prognostické ukazatele. Je důležité určit virovou nálož před léčbou a potom ve stanovených intervalech sledovat hladinu virémie a její eventuální pokles (odezva na léčbu). K screeningovému vyšetřování HCV se používá nejčastěji ELISA, alternativní metodou je imunoblotovací technika RIBA. Sérologické testy nejsou dostatečně citlivé a spolehlivé a především neumožňují rozlišení chronického onemocnění,

s různě kolísajícími hladinami protilátek, od stavu po překonané infekci. Nejcitlivější metodou průkazu aktivní infekce HCV je stanovení virových RNA v séru pomocí PCR. Nález bývá pozitivní počátkem druhého týdne po infekci. [23]

Technika monitorování léčby infekčních onemocnění pomocí PCR se datuje od roku 1994. První verze byly manuální a zatížené individuální chybou (pipetování). Proto byly přivítány možnosti automatického zpracování na analyzátorech a to koamplifikací vzorku pacienta s interním standardem a následným výpočtem koncentrace virové nálože. Tím bylo umožněno sledovat odpověď pacienta na léčbu interferonem alfa a dalšími virostatiky. Díky monitorování byly vyvinuty nové léky i proti HIV (inhibitory proteáz). Vývoj těchto metod potom pokračoval real time PCR, kdy se měří každý nově utvořený řetězec pomocí světelného signálu.

Na našem oddělení ÚBAP FNKV (Ústav biochemie a pathobiochemie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady) se stanovuje virus hepatitidy C testem COBAS<sup>®</sup> AMPLICOR version 2.0. Je to kvalitativní test in vitro pro detekci RNA viru hepatitidy C na analyzátoru COBAS<sup>®</sup> AMPLICOR<sup>TM</sup>.

Test sestává z pěti základních stupňů a je doplněn o HCV Internal Control., který je zpracováván souběžně s biologickými vzorky. U PCR mohou inhibitory, které se nacházejí v klinickém vzorku, snižovat účinnost amplifikace. Proto se využívá kontrola, což je RNA transkript s oblastmi vazby primeru identickými s těmi, které jsou v terčové sekvenci HCV a se specifickou sekvencí vazby sondy, kterou se kontrola odlišuje od terčového amplikonu. Je to proto, aby byla zajištěna ekvivalentní amplifikace kontroly a terčového HCV.

Pro cílovou sekvenci RNA se musí vytipovat takové oblasti v genomu HCV, kde se mezi jednotlivými genotypy HCV sekvence v maximální míře zachovává. To znamená, že pro schopnost testu detekovat všechny genotypy má zásadní důležitost správná volba primerů i sondy.

- Příprava vzorku: RNA HCV se ze séra nebo plazmy izoluje lýzou virových částic pomocí chaotropního činidla a následným srážením RNA alkoholem. Do vzorku se s činidlem zavádí i interní kontrola (kontroluje extrakci, amplifikaci a detekci).

- Reverzní transkripce a PCR amplifikace: reverzní transkripce a amplifikace se provádí najednou v jedné zkumavce pomocí tepelně stálé DNA polymeras rekombinantní *Thermus thermophilus* (rTth pol). Tento enzym v přítomnosti  $Mn^{2+}$  a za vhodných pufr. podmínek při teplotě 50°C má aktivitu reverzní transkriptázy, zatímco v přítomnosti  $Mg^{2+}$  a při teplotě nad 60°C má aktivitu DNA polymerázy, což umožní průběh obou pochodů v jedné reakční směsi. Antisense primer je na 5' konci biotinylován, sense primer ne. V reakční směsi se antisense primer napojuje na terčovou RNA HCV vzorku i kontroly, ve směsi je nadbytek deoxynukleosid-trifosfátů (kromě thymidinu), rTth pol prodlužuje napojený primer a vytváří řetězec DNA (cDNA) komplementární vůči terčové RNA. Amplifikace terče: po reverzní transkripci se reakční směs zahřeje, aby se RNA:cDNA hybrid denaturoval a exponovaly se sekvence primerového terče. Během ochlazování směsi se sense primer připojuje specificky k řetězci cDNA, rTth pol primer prodlužuje a syntetizuje se druhý řetězec DNA. Tak končí první cyklus PCR, který poskytuje dvouřetězovou DNA kopii terčové oblasti RNA HCV pacienta a kontroly. Postup se opakuje (počet cyklů se nastaví v programu) a vznikají amplikony (dvouřetězové DNA). V každém cyklu se počet amplikonů zdvojnásobí. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genomu HCV mezi primery (celý genom není amplifikován). Pro selektivní amplifikaci terčové NK z klinického vzorku se používá enzym AmpErase® (uracil-N-glykosylasa) a deoxyuridintrifosfát (dUTP). Protože se deoxyuridin v přirozené DNA nevyskytuje, je pouze v kontaminujícím amplikonu (v činidle Master Mix je místo thymidintrifosfátu použit deoxyuridintrifosfát), je tento amplikon selektivně destruován enzymem AmpErase®.
- Hybridizační reakce: po PCR amplifikaci přístroj automaticky nadávkuje do zkumavek denaturační roztok, aby HCV amplikony vzorku i kontroly denaturovaly a vytvořily jednořetězovou DNA. Alikvotní podíly obou se převedou do detekčních kelímků, přidá se suspenze magnetických částic potažených oligonukleotidovou sondou specifickou pro NK vzorku nebo kontroly. Na terčově specifické oligonukleotidové sondy navázané na



magnetické částice jsou hybridizovány biotinem značené amplikony vzorku a kontroly. Tím se zvyšuje specifčnost testu.

- Detekční reakce: po hybridizační reakci analyzátor propláchne v detekčním kelímku magnetické částice, tím se odstraní nenavázaný materiál a přidá se konjugát avidinu s křenovou peroxidázou. Tento konjugát se váže na biotinem značený amplikon hybridizovaný na sondy navázané na magnetické částice. Nenavázaný konjugát se opláchnutím magnetických částic odstraní. Přidá se substrát 3,3', 5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) a peroxid vodíku. Za přítomnosti peroxidu vodíku katalyzuje křenová peroxidáza oxidaci TMB na barevý komplex, který se proměřuje při 660 nm. [24]

### 6.1.2. Herpetické viry

Herpesviry jsou obalené DNA-viry střední velikosti s kapsidou kubické symetrie. Replikují se v jádře hostitelské buňky.

EBV-DNA-PCR se používá v diagnostice chronické aktivní infekce a především potransplantačního lymfoproliferativního syndromu. Je nutná kvantifikace procesu, protože nízkou pozitivitu lze prokázat i u zdravých jedinců. [17]

Cytomegalovirus (CMV) - význam diagnostiky CMV narůstá v souvislosti s rozšiřováním transplantačních programů (solidních orgánů i kostní dřeně) a s přibýváním osob s imunodeficitem. Průkaz aktuální aktivity infekce je založen na izolaci nebo přímé detekci viru. Nález CMV v sekretech, moči a slinách (pokud se netýká novorozenců) nemá jednoznačný význam, protože může být výrazem bezpříznakového vylučování viru (i u zdravých jedinců). Klinicky relevantní je izolace z krve. PCR a hybridizace in situ umožňují přímý průkaz v postižených orgánech (játra, plíce...). [25]

CMV infekce je jednou z nejčastějších komplikací, která zvyšuje morbiditu a mortalitu nemocných po alogenní transplantaci kostní dřeně. Nejčastější manifestací CMV infekce je intersticiální pneumonie a gastroenteritida. Mezi rizikové faktory patří např. neshodný dárce v HLA systému, nízké hodnoty CD4+ T-lymfocytů. Jako prevence vzniku CMV nemoci je profylaxe ganciclovirem pro všechny rizikové pacienty, nevýhodou tohoto přístupu jsou nepříjemné vedlejší účinky (myelotoxicita, nefrotoxicita). Druhá možnost je pre-emptivní léčba, to je podání gancicloviru při průkazu aktivní CMV

infekce před vznikem CMV nemoci. Tato strategie vyžaduje použití senzitivních a specifických testů k rychlé diagnóze CMV infekce. Nejvíce používanými testy jsou antigenémie (detekce CMV antigenu pp65 v leukocytech), patřící mezi nákladnější vyšetřovací techniky a PCR. Při sledování CMV infekce po transplantaci kostní dřeně na hemato-onkologickém oddělení FN v Plzni pomocí dvoustupňové "nested"-PCR bylo zjištěno, že se CMV nemoc nerozvinula u pacientů s negativním PCR vyšetřením nebo jedním pozitivním. Pozitivita PCR předcházela ve všech případech vzniku nemoci. [26] Další možností aplikace PCR je detekce bodových mutací v UL97 genu (kóduje virovou protein kinasu) HCMV spojených s rezistencí vůči gancicloviru. Po transplantacích je mnohdy dlouhodobá terapie ganciclovirem nezbytná a její nevýhodou je možnost vzniku rezistentních kmenů a selhání léčby. Klasické metody vyšetření citlivosti antivirových léčiv založené na kultivaci viru jsou spolehlivé, ale časově náročné. Jednou z možností rychlejšího postupu a relativní finanční dostupnosti je polymerázová řetězová reakce. [27] CMV-DNA-PCR má diagnostický význam i u kongenitální CMV infekce. V návaznosti na výsledky vyšetření matky lze vyšetřit amniotickou tekutinu (21-22 gestační týden). [17]

### **6.1.3. *Chlamydia trachomatis***

Je gramnegativní bakterie. V lidském těle se množí v epitelu urogenitálního systému, spojivek, dýchacích cest, v makrofázích a u chronických infekcí se setkává také s poškozením kloubní výstelky nebo endotelu. Manifestace v močových a pohlavních orgánech ji řadí mezi sexuálně přenosné nemoci. Extracelulárně mají chlamydie podobu drobných infekčních elementárních tělísek (ET). Až v napadených buňkách, tedy intracelulárně, se ET transformuje v neinfekční, ale metabolicky aktivní retikulární tělísko (RT). Dělení probíhá za spotřeby hostitelské ATP (hostitelský parazitizmus). Výsledkem dělení může být až 10 000 nových ET v buňce, k jejich uvolnění dochází rupturou buňky nebo exocytózou (buňka přežívá-chronicita). Chlamydie jsou zcela odkázané na svého hostitele a vytvořily si mechanismy, které umožňují jeho dlouhodobé přežívání zpravidla bez poškození vitálních buněk. [28] Pro diagnostiku Chlamydií bylo zavedení PCR převratnou metodou. Kultivace těchto bakterií je obtížná, je velmi závislá na transportu do laboratoře. Nevýhodou enzymatických metod, je nižší specifita, protože dochází ke zkřížené reaktivitě mezi chlamydiovými glykoproteinosacharidy a antigeny některých gramnegativních bakterií. Detekce chlamydií pomocí PCR shrnuje výhody, kterými

převyšují ostatní metody. Je to až 99% specifita a nesmírně vysoká senzitivita, která umožňuje zachytit v odebraném materiálu jedinou celistvou kopii NK patogenu. Při léčbě patogenů dochází také k degradaci jejich NK a tak se PCR může používat k monitorování účinnosti terapie. V současnosti se k diagnostice chlamýdií používají amplifikační metody: buď polymerázová řetězová reakce (PCR) nebo amplifikace zprostředkovaná transkripcí (TMA). [29]

Na našem oddělení se dlouhodobě používá test COBAS Amplicor CT/NG pro detekci chlamýdií z výtěrů cervix uteri, urethrálních výtěrů a ze vzorků moči. Je to multiplexní test, kterým se dá amplifikovat současně cílová DNA *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* a vnitřní kontroly.

#### **6.1.4. *Treponema pallidum***

*Treponema pallidum* subspecies *pallidum* je primárně patogenní pro člověka, který je také jejím jediným hostitelem v přírodě. Je původcem syfilis. Podle údajů ÚZIS došlo v letech 1990-2002 na území ČR ke vzestupu počtu prokázaných infekcí. Od roku 1990 se v ČR opět objevuje kongenitální syfilis. Toto závažné postižení plodu je ve vyspělých zemích považováno za zbytečný důsledek opomíjení rutinní diagnostiky syfilis u gravidních žen nebo jejího selhání. Sérologická diagnostika syfilis není bez úskalí. Použití PCR k přímému průkazu DNA TPP v suspektních lezích a v liquoru přináší téměř 100% specifitu (jiná treponemata v naší oblasti mají jinou homologii genomu). PCR umožňuje genotypizaci a na základě rodově specifických sekvencí i kvantifikaci mikroorganismů, rozlišení živých a mrtvých buněk na základě genové exprese pomocí RT-PCR (reverzní PCR). Lze vyšetřovat různé druhy biologického materiálu - stěry z lézí, biopsie, plnou krev, mozkomíšní mok, tkáň, amniovou tekutinu. Materiál není nutno zpracovávat bezprostředně po odběru a je možné jej přepravovat bez zvláštních opatření. Pro identifikaci *T. pallidum* používáme FRET sondy. [30]

#### **6.1.5. Mykobakterie**

Mycobakteria jsou acidorezistentní, nepohyblivé aerobní bakterie tvaru tyčky se zvláštní stavbou bakteriální stěny. Zahrnují několik druhů, které jsou patogenní pro člověka. Primární humánní patogeny jsou ty druhy, které zahrnuje komplex

*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*), *M. leprae*. Z fakultativních patogenů pak *M. avium*, *M. intracelulare* a *M. kansasii*. *M. tuberculosis* je nejdůležitější z mykobakteriálních patogenů, postihuje pouze člověka a přenáší se kapénkovou infekcí. Může způsobovat chronické plicní onemocnění, ale současně může infikovat jakýkoliv jiný orgán v těle. Kvůli riziku šíření choroby, závažnosti onemocnění a riziku vzniku rezistence na léky je rychlá diagnóza komplexu *M. tuberculosis* extrémně důležitá. Izolace organismu z komplexu *M. tuberculosis* je nezbytná k definitivní diagnóze tuberkulózy.

Rutinní kultivace je časově náročná a může trvat až osm týdnů do stanovení diagnózy. Mikroskopické stanovení acidorezistentních nátěrů je nejrychlejší metodou, ale je málo selektivní a nespecifické. Z téhož důvodu jsou omezené i imunologické a sérologické techniky. Vývoj testů založených na PCR specifických pro mykobaktérie zlepšil rychlou diagnostiku tuberkulózy tím, že umožnil přímou detekci mykobakterií v klinických vzorcích. [31] V naší laboratoři používáme PCR test COBAS AmpliCor MTB, MAV a MIN. Amplifikuje se 586 bp dlouhá rodově specifická sekvence genu kódujícího 16S rRNA, v jejíž střední variabilní části se následně druhově specifickými detekčními sondami MTB prokazují komplementární sekvence genomu patogenních mykobakterií. Jako vzorky z dýchacích cest je možno použít vykašlané nebo indukované sputum, bronchiální výplachy a bronchoalveolární laváž (BAL) odebrané do sterilních plastových kontejnerů. Vzorky musí být zkapalněny, dekontaminovány a koncentrovány za použití NaOH nebo SDS- NaOH. [31]

**PO AMPLIFIKACI 586-NUKLEOTIDOVÉHO RODOVĚ SPECIFICKÉHO ÚSEKU MYKOBAKTERIÍ A DENATURACI NÁSLEDUJE**

**1. DETEKCE INTERNÍ KONTROLY a MYKOBAKTERIÍ RODOVĚ SPECIFICKOU SONDOU:**

a) INHIBICE ----- ukončit testování  
b) NEGATIVNÍ MYG ----- ukončit testování, nejedná se o mykobakterium  
c) POZITIVNÍ MYG ----- testovat *M. tuberculosis*

**2. DETEKCE SONDOU MTB:**

a) POZITIVNÍ MTB ----- ukončit testování, jde o *M. tuberculosis*  
b) NEGATIVNÍ MTB ----- testovat *M. avium*

**3. DETEKCE SONDOU MAV:**

a) POZITIVNÍ MAV ----- ukončit testování, jde o *M. avium*  
b) NEGATIVNÍ MAV ----- testovat *M. intracelulare*

**4. DETEKCE SONDOU MIN:**

a) POZITIVNÍ MIN ----- ukončit testování, jde o *M. intracelulare*  
b) NEGATIVNÍ MIN ----- testovat hybridizačními sondami na další původce mykobakterií.

Obr. 17 - Schéma detekce Mykobakterií [32]

## 7. Riziko kontaminace a inhibice PCR

Odebraný biologický materiál je často unikátní a mnohdy není možný nový odběr. Aby se zamezilo možnosti inhibice vzorku pro stanovení metodou PCR je nutné dodržet základní podmínky pro práci. Pracovní tok v laboratoři musí probíhat jednosměrně, od předamplifikačního prostoru k prostoru poamplifikačnímu. Pomůcky a vybavení musí být přiřazeno určitým činnostem a nesmějí se používat k jiným, ani být přenášeny mezi jednotlivými prostorami. Jednotlivé pracovní operace musí být prostorově odděleny. Jsou používány laminární boxy, kde je pracovní prostor sterilizován UV světlem. DNA je velmi stabilní, vyskytuje se na pracovních plochách, předmětech, poletuje ve vzduchu.

K falešnému výsledku díky velké citlivosti reakce stačí kontaminace vzorku aerosolem s amplikony z předchozích reakcí. Z toho důvodu se používají špičky s filtry, aby se zabránilo kontaminaci mechaniky pipet, je nutné používat rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Používají se negativní kontroly a slepé vzorky, pomůže dočasná změna primerů. Součástí komerčních reakčních směsí je enzym uracil-N-glykosylasa (AmpErase<sup>®</sup>), která destruuje vlákna obsahující deoxyuridin (ten není přítomen v přirozeně se vyskytující DNA), ale vynechává vlákna obsahující deoxythymidin. Princip spočívá v tom, že při amplifikaci dTTP (deoxythymidintrifosfát) je v reakční směsi nahrazen dUTP (deoxyuridintrifosfátem). Amplifikovaná DNA má tedy na všech místech vyhrazených thymidinu uridin. Pokud by byl vzorek s přírodní DNA v laboratoři kontaminován amplikony, enzym systému AmpErase<sup>®</sup> přidaný do reakční směsi, štěpí pouze DNA obsahující uridin a tím jsou degradovány všechny fragmenty DNA pocházející z předcházejících PCR. Aby nebyla narušena nová amplifikace, je samotný enzym inaktivován vysokou teplotou při prvním denaturačním cyklu.

Ve vyšetřovaném vzorku se může nacházet řada látek způsobující inhibici PCR, která se projeví falešnou negativitou vyšetření. Mezi známé inhibitory patří škrobový pudr nebo talek, kterým se vysypává vnitřek latexových rukavic. Proto se pro tento účel používají jen tzv. powder-free rukavice. Dalšími inhibitory jsou hem (součást hemoglobinu), proto je třeba u plné krve nebo zkrvavených materiálů erytrocyty zcela odseparovat. Inhibitory jsou heparin, při odběrech nesrážlivé krve je ho třeba nahradit jiným antikoagulantem nejčastěji EDTA. Dalšími inhibitory jsou zbytky fosfátů na

laboratorním skle (používají se při mytí skla), příměs slizničního hlenu ve vzorku, alkoholy, anestetika, metabolity léků. Falešným negativním výsledkům těchto vzorků se zamezuje vnitřní kontrolou, kterou kvalitní komerční diagnostické soupravy obsahují. Interní kontrola v těchto testech pracuje na principu koamplifikace NK ve vzorku se synteticky připraveným řetězcem DNA, který má shodný počet nukleotidů a identické koncové sekvence s amplifikovaným úsekem DNA ze vzorku. Koncentrace vnitřní kontroly je na prahu citlivosti metody, aby nedošlo k její amplifikaci na úkor vzorku. Shodný počet nukleotidů vzorku a kontroly umožňuje použít shodný amplifikační profil. [32]

<i>Průkaz amplifikace inf.agens</i>	<i>Průkaz amplifikace int. kontroly</i>	<i>Výsledek vyšetření:</i>
<i>pozitivní</i>	<i>pozitivní</i>	<i>pravdivě pozitivní</i>
<i>pozitivní</i>	<i>negativní</i>	<i>pravdivě pozitivní*</i>
<i>negativní</i>	<i>pozitivní</i>	<i>pravdivě negativní</i>
<i>negativní</i>	<i>negativní</i>	<i>INHIBICE PCR</i>

Obr.18 - Použití interní kontroly a její význam [32]

## 7.1. Inhibitory DNA polymerasy v biologických vzorcích

Metody PCR jsou již přizpůsobeny běžnému rutinnímu diagnostickému provozu (sofistikované postupy izolace nukleových kyselin, ochrana před kontaminací vyšetřovaného vzorku aerosolem s amplikony z předchozích reakcí, propracované metody detekce produktu amplifikační reakce), existují stále mnohá úskalí, které je třeba vyřešit. Jedním z nich je přítomnost inhibitorů polymerasy v odebraném biologickém vzorku. Pokud se tyto inhibitory dostanou společně s izolovanou nukleovou kyselinou do reakční směsi mohou způsobit falešnou negativitu vzorku inhibicí enzymu. Inhibitory PCR jsou látky různé povahy, které jsou buď přítomné přímo v biologickém materiálu nebo se do něj dostanou manipulací s ním. Výrazně omezí nebo zcela zastaví aktivitu DNA polymerasy a tím znemožní amplifikaci nukleové kyseliny.

Nežádoucím snížením záchytu infekčního agens ve vzorcích v důsledku přítomnosti PCR inhibitorů můžeme zamezit několika způsoby :

- Zamezením kontaktu vyšetřovaných vzorků známými PCR inhibitory (separace erytrocytů, rukavice bez pudru, mycí prostředky bez fosfátů).

- Používání vhodných laboratorních pomůcek (špičky a zkumavky ze speciálních hmot neuvolňujících inhibitory).
- Odstraněním funkce inhibitorů ve vzorcích (eliminace inhibitorů opakovaným zmrazováním, rozmrazováním, uchováním po určitou dobu v chladu nebo ředěním).

V současné době se vyvíjejí další metody, které naopak izolují z vyšetřovaných vzorků pouze čistou DNA a inhibitory jsou vymyty i se zbytkem vzorku (specifické DNA sondy nebo adsorbéry imobilizované na magnetickém nosiči). Tato technika vstoupila na trh v roce 2001 v automatizované podobě pod názvem COBAS<sup>®</sup> AMPLIPREP. Kapacitou vyhovuje velkým laboratořím. Menší variantou jsou systém MagNA Pure<sup>®</sup> doporučený k Lightcycleru a MagNA Pure Compact<sup>®</sup>. [33]

### 7.1.1. Studie inhibitorů DNA polymerasy na přítomnost *Chlamydia trachomatis*

Lékaři pracující na našem oddělení ÚBAP FNKV prováděli v laboratoři molekulárně biologických metod BIOMOL studii inhibice výtěrů z urethry a z cervixu uteri, které pocházely z rutinních odběrů ambulancí a lůžkových oddělení tří pražských fakultních nemocnic a několika poliklinik, v letech 1996 - 1998. Do studie bylo zařazeno 100 pozitivních vzorků z běžné rutinní diagnostiky (*Chlamydia trachomatis*-CT a *Neisseria gonorrhoeae*-NG). Studie byla zopakována v letech 2003 - 2004, materiál tvořilo 723 vzorků odebraných na různých klinických pracovištích a k výtěrům z urethry a z cervixu uteri byly přidány výtěry ze spojivkového vaku. [33] [17]

**Použité soupravy:** Rutinní vyšetření provádíme systémem COBAS<sup>®</sup> AMPLICOR (Roche Diagnostic systems).

Odběrové soupravy: pro odběr moče čisté polypropylénové nádoby bez konzervačních přísad (skladování - do 24 hodin při pokojové teplotě, do 7 dnů teplota 2-8 °C, do dvou měsíců -20 °C). Souprava pro výtěr z urethry a z cervixu uteri: obsahuje dva silnější dakronové tampony na plastických tyčinkách (jeden pro odstranění cervikálního hlenu a druhý pro výtěr) a tenčí tampon pro výtěr z uretry. Dále zkumavku s médiem sloužícím pro transport vzorku, do kterého je stěr po odběru vytřepán, tampon je vyhozen. Do 10 dnů lze skladovat při pokojové teplotě.

Souprava pro přípravu vzorku: obsahuje směs pufrů, diluentů a detergentů, lze z ní zpracovat vzorky odebrané v médiu pro kultivaci a provést kultivační průkaz i vyšetření testem Amplicor.

Amplifikační souprava: CT/NG amplification kit obsahuje Master Mix, primery s biotinem, Taq DNA polymerasu, nukleotidy, a pozitivní kontrolu pro chlamydie, neisserie a vnitřní kontrolu.

Detekční souprava pro automatizovaný systém COBAS<sup>®</sup> AMPLICOR: detekční soupravy pro CT, NG a vnitřní kontrolu

AMPLICOR Generic Reagent Kit: obsahuje kazety se substráty, denaturačním roztokem a avidinovým konjugátem.

V první studii bylo 100 pozitivních vzorků inhibováno při prvním vyšetření testem Amplicor CT/NG s interní kontrolou a pozitivita těchto vzorků byla zaručena jinou standardní vyšetřovací technikou. Každý ze vzorků byl rozdělen na tři části a každá byla zpracována odlišným způsobem 3 metodami eliminace inhibitorů DNA.

1. Opakované zmrazování a rozmrazování vzorků.
2. Uskladnění vyšetřovaných vzorků v chladu (4 °C) po několik dnů.
3. Ředění roztoků (1:5, 1:10, 1:100).

### **Výsledky:**

Při uskladnění vzorků v chladničce po dobu pěti dnů při teplotě +4 °C (vzorky byly denně testovány), se počet vzorků s inhibicí snižoval v závislosti na době uskladnění.

Tab.1: Uložení vzorků při 4 °C [33]

<b>Fáze pokusu</b>	<b>Inhibováno vzorků</b>
začátek	100
2.den	91
3.den	69
4.den	32
5.den	3



Při ředění ubývalo inhibovaných vzorků podle tabulky, ze zbývajících 69 vzorků kde při ředění 1:100 nebyla prokázána inhibice, nebyla ve 22 prokázána ani nukleová kyselina *C. trachomatis*.

Tab. 2: Vliv ředění na inhibici PCR [33]

Ředění	Inhibováno vzorků
výchozí koncentrace	100
1:5	98
1:10	72
1:100	31

Při opakovaném zmrazování a rozmrazování počet inhibovaných vzorků klesá s počtem cyklů. V souvislosti s opakovaným zamrazováním a rozmrazováním byla zjišťována i stabilita DNA vyšetřovaného agens. Ze sta pozitivních vzorků byla izolována DNA, byla zmrazena a rozmrazena v pěti cyklech a po každém cyklu byla testována část vzorku. Počet pozitivních vzorků od 3. dne dramaticky klesl.

Tab.3: Opakované zmrazování a rozmrazování vzorků [33]

Fáze pokusu	Inhibováno vzorků
začátek	100
po 1. cyklu	75
po 2. cyklu	53
po 3. cyklu	29
po 4. cyklu	0

Tab.4: Stabilita DNA při opakovaném zmrazování a rozmrazování vzorku [33]

Fáze pokusu	Inhibováno vzorků
začátek	100
po 1. cyklu	100
po 2. cyklu	98
po 3. cyklu	84
po 4. cyklu	41
po 5. cyklu	21

Při první studii bylo zjištěno, že inhibitory DNA lze odstranit všemi uvedenými postupy, ale s různou efektivitou a rizikem ztráty DNA. Ředění vzorku se jeví jako nejméně vhodná metoda, pro riziko snížení koncentrace prokazované nukleové kyseliny pod práh detekční citlivosti nelze doporučit větší ředění než 1:10 a inhibitory se v tomto případě podařilo eliminovat pouze ve 28% vzorků. Opakované zmrazování a rozmrazování

je nejméně náročné na čas, protože jej lze provádět v rychlém sledu. V našem případě trojí opakování mělo účinek téměř 80% a u DNA došlo ke znehodnocení v 16% případech. Při vyšším počtu cyklů se dramaticky zvýší degradace DNA. Dobrých výsledků bylo dosaženo skladováním vzorků při 4 °C, po 5 dnech přetrvávala inhibice pouze ve 3% vzorků. Tento způsob je nejméně pracný a když není časová tíseň, může být metodou volby. [33]

Druhá studie byla prováděna v roce 2003, kdy bylo standardně zpracováno 545 vzorků. Z toho bylo 97 cervikálních výtěrů, 88 uretrálních výtěrů, 346 vzorků moče a 14 výtěrů z oka. Přítomnost inhibitorů byla prokázána ve 28 cervikálních výtěrech, 69 uretrálních výtěrech a 28 vzorcích moči a 3 výtěrech z oka. Porovnání jednotlivých technik bylo realizováno na vzorcích vyšetřovaných v roce 2004, každý byl rozdělen na čtyři díly a zpracován technikami osvědčenými v první studii.

Tab. 5.: Procentuální výsledky druhé studie v roce 2004 [17]

	<b>Výtěr cervix uteri</b>	<b>Výtěr z urethry</b>	<b>Moč</b>	<b>Výtěr ze spojivkového vaku</b>
<b>% inhibovaných vzorků</b>	%	%	%	%
<b>Bez ošetření</b>	27,6	70,9	4,9	21,4
<b>48 hod. při 4°C</b>	25,8	64,5	3,3	21,4
<b>2 cykly zmraž, rozmraž</b>	10,3	12,9	1,6	14,2
<b>2 cykly + 12 hod. při 37</b>	1,7	9,6	1,6	0

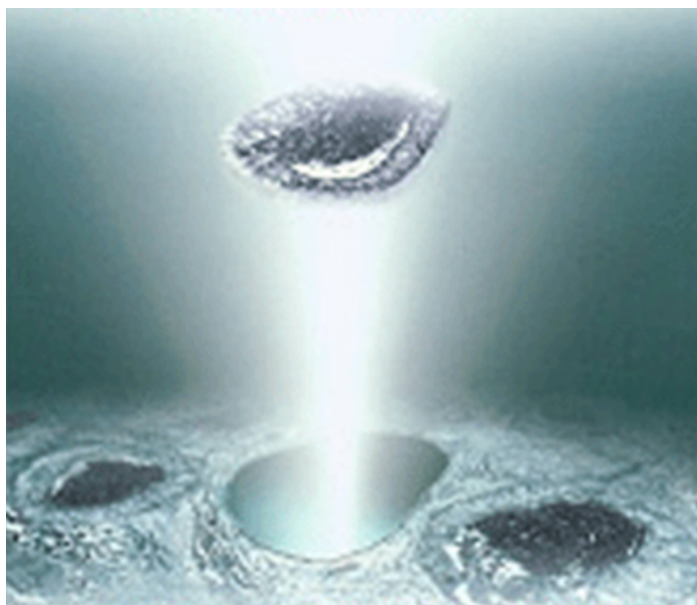
Při druhé studii byly v podstatě potvrzeny výsledky té první, nejnižšího počtu inhibic bylo dosaženo u vzorků 2x zmražených a rozmražených a následně inkubovaných při 37 °C. Ošetřování vzorků moči tímto způsobem doporučeno nebylo, protože má na odstranění inhibic minimální vliv a četnost inhibic je nižší. [17]

**Závěr:** Problém inhibice DNA ve vyšetřovaných vzorcích byl na našem oddělení vyřešen používáním systému izolace vzorku pomocí MagNA Pure Compact® System v kombinaci ROTOR GENE, který eliminuje inhibici DNA, tím že izoluje z vyšetřovaných vzorků pouze čistou DNA a inhibitory jsou vymyty i se zbytkem vzorku. Správný odběrový materiál a dodržování postupů preanalytické fáze zajišťuje, že případné inhibice jsou výjimkou a jsou většinou způsobeny nesprávným odběrem materiálu.

## 8. Budoucnost molekulárně biologických technik

Molekulárně biologické techniky se v dnešní době bouřlivě rozvíjejí. Umožňují rozšířit molekulárně biologické diagnostické techniky do dalších oblastí biologických věd. Za revoluční technologii lze označit automatickou bezkontaktní laserovou mikrodisekci vzorku s následnou tlakovou katapultáží. Je výsledkem více než desetiletého vývoje mikromanipulačních a laserových systémů a jejich aplikací v medicíně a biologii.

Technologii lze použít na živé buňky z biopsií, z buněčných kultur, mikroskopické nátery barvené různými postupy, zmrazené vzorky či fixované mikrotomové řezy tkání. Výběr prakticky není omezen. Tato technologie je bezkontaktní a lze ji tudíž použít i u vysoce infekčního materiálu s minimálním rizikem kontaminace. Využívání laserových paprsků umožňuje zachování živých buněk. Laserové paprsky zabudované do mikroskopu jsou přiváděny do sledovaného objektu a požadovanou strukturu vyříznou a pulsem přenesou do sběrného zařízení. Při tlakové katapultáži nedojde k zahřátí ani spálení objektu, živé buňky tento proces přežijí a je možné je kultivovat. Uvedená technologie má široké využití pro práci s živými buňkami, při analýze mRNA, izolaci chromosomů, lze ji využít ve forenzní medicíně a po lýze vzorku i pro hybridizační záchyt nukleové kyseliny. [34]



Obr. 19 -Laserová katapultáž [41]

## 9. Diskuze

Jestliže klinická biochemie prošla technickou revolucí v osmdesátých letech, mikrobiologické obory tímto procesem procházejí teprve v letech devadesátých a v 1.dekádě tohoto století. Postupně se přechází se od klasických metod (mikroskopické preparáty, kultivace, sérologie) k detekci pomocí genetických sond. Vede k tomu rozvoj nových technologií a postupné mapování genomu, s jehož pomocí se dají identifikovat jednotlivá infekční agens. Vzhledem k tomu, že nové technologie jsou ve vývoji, potýkají se s celou řadou problémů. Nové technologie a diagnostické soupravy jsou finančně náročné. Dalším omezením je rozdílnost technologií, jež jsou založeny na rozdílných principech. Potýkají se i s problémem inhibice vzorku. Požadavky kladené na metody jsou vysoká citlivost, široký dynamický rozsah měření, reprodukovatelnost výsledků mezi laboratořemi a možnost použití pro rutinní aplikace. V devadesátých letech převažovaly tzv. in-house molekulární metody, dnes převažují komerční testy. Je velký tlak na efektivitu a standardizaci. I v oblasti *in vitro* diagnostiky jsme zavázáni k dodržování platné legislativy EU a používání výrobků se známkou CE. Podle norem řízení kvality je nutná validace a verifikace přístrojů, souprav a metodických postupů. Výrobce je povinen své výrobky validovat, to znamená doložit, že jsou splněny požadavky na specifické použití metody a že tyto postupy byly ověřeny experimentálně. Na uživateli je potom verifikace, neboli ověření, zda jsou analytická data poskytnutá výrobcem dosahována v dané laboratoři a zda jsou všechny technologické postupy dodržovány. Problémy se vyskytují i v oblasti mezilaboratorní kontroly, protože ne pro celou oblast diagnostiky je dostatek referenčních a kontrolních materiálů. U mnohých infekčních agens chybí návaznost kalibrátorů na standardy vyššího řádu. Přes všechny tyto potíže se např. real-time PCR prosazuje celosvětově v diagnostických laboratořích, a to pro svoji vysokou senzitivitu a dynamické rozpětí 10 řádů. Pokud jsou tyto techniky považovány někde za spíše doplňkovou a poměrně nákladnou diagnostiku, je to neprávem.

Využití real-time PCR je široké, může se používat ke kvantifikaci virové (mikrobiální) nálože, zjištění rozvíjející se rezistence na danou léčbu, je možné stanovit prognózu onemocnění. Pomocí PCR můžeme rozlišit subtypy infekčních agens nebo detekovat bodové mutace, které způsobují rezistenci vůči antibiotikům.

Např. monitorování antivirové terapie může zároveň pomáhat v pochopení patogeneze virové hepatitidy typu C. Proto je důležité stanovení genotypu viru a sledování kinetiky virémie a kvantifikace virové nálože, což jsou důležité prognostické ukazatele. HCV nelze kultivovat a sérologické testy nejsou dostatečně citlivé, je však zmapován celý jeho genom. Tento virus je parenterálně přenosný a zejména pro transfuzní službu představuje hrozbu. Všichni dárci se musí vyšetřit a v případě hraničních výsledků serologických testů je třeba provést konfirmační ELISA test od jiného výrobce. V případě dalších pochybností se provádí technika rekombinantního imunoblotu RIBA. Nezřídka se stává, že náklady na vyšetření dosáhnou ceny PCR, nebo ji dokonce překročí.

Pomocí kvantitativní PCR je možné sledovat i riziko komplikací CMV infekce po transplantacích. Je možné včas podchytit všechny rizikové pacienty a dostatečně brzo je zaléčit, aby se předešlo vzniku komplikací. Zároveň je tímto vyšetřením možné oddělit pacienty negativní a zbytečně jim nepodávat lék s vedlejšími účinky.

Je také možné sledovat epidemiologii pohlavně přenosných infekcí, kde je výhodou vysoká senzitivita PCR tam, kde jsou problémy s identifikací agens klasickými metodami. Vzhledem k závazné povinnosti hlásit onemocnění pohlavně přenosnými nemocemi se snaží hlavně muži léčit sami. Pokud s přetrvávajícími potížemi přece jen vyhledají specialistu tak např. pomocí PCR lze identifikovat DNA i z mrtvých gonokoků. PCR umožňuje genotypizaci tam, kde klasické metody selhávají.

## **10. Závěr**

V této práci jsem se snažila přiblížit nejen princip klasické polymerázové řetězové reakce, ale také její různé modifikace a alternativy. Některé se rozšířily v rutinních laboratořích, jiné se dnes již nepoužívají např. pro nemožnost zabudování vnitřní kontroly amplifikace (ligázová řetězová reakce). Použití PCR je široké, což umožňuje i reverzní transkripce (při průkazu RNA virů), dále možnost namnožení jen jednoho z řetězců DNA při asymetrické PCR, nebo využití Nested PCR při nízké výchozí koncentraci templátu.

Úspěšnost této náročné technologie však nestojí jenom na dostatečném přístrojovém vybavení a komerčních testech, ale také na takové zdánlivě nedůležité záležitosti, jako je správný odběr materiálu do vhodných odběrových systémů a na

kvalitním provedení preanalytické fáze. Dobré ošetření a uložení materiálu před vlastní analýzou zabrání inhibici a znehodnocení vzorků.

V horizontu pěti, deseti let s rozvojem přístrojového vybavení, používáním většího množství diagnostických souprav by se tyto metody mohly nacházet v příznivějších cenových relacích, což při nesporných výhodách, které mají, určitě povede k jejich většímu rozšíření. Je také důležité, aby o výhodách a omezeních jednotlivých vyšetřovacích metod měl dostatečné informace každý lékař a mohl tak správně indikovat laboratorní vyšetření.

## 11. Seznam použité literatury

- [1] P.Jílek, V.Buchta, P.Kubanová, M.Förstl : Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví, Karolinum 2002.
- [2] Chaloupecký V.: Genetika bakterií, Bednář M. a kol.: Lékařská mikrobiologie, Marvil Praha 1996, str. 114
- [3] Pavlík E., Molekulárně biologické techniky pro mikr. dg. část 2, str. 23-26; Labor aktuell <http://www.roche-diagnostics.cz/la/odborne.asp>, duben 2008
- [4] Křemen J., Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně, 1. vyd. 1998, str. 89-90
- [5] Upraveno podle prezentace "Polymerase chain reaction", Amplicor<sup>TM</sup> PCR Academy, Roche Diagnostics, Basilej
- [6] Křemen J., Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně, 1. vyd. 1998, Uspořádání klas. PCR, kap.11.1.1.1.
- [7] Pavlík E., Molekulárně biologické techniky pro mikr. dg., část 3, Labor aktuell 02/99, str. 24-25
- [8] Křemen J., Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně, 1. vyd. 1998, RT -PCR, Nested PCR, kap.11.1.3.
- [9] Pavlík E., Mol. biol. tech. pro mikrobiologickou diagnostiku, část 6, Labor Aktuell 01/00 str. 18-21
- [10] Zdeněk Kolář, Úvod do molekulární patologie a onkologie, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc 1997, str. 24-25
- [11] Křemen J., Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně, 1. vyd. 1998, TMA, SDA , kap.11.2.2.;11.2.3.
- [12] Pavlík E., Mol. biol. tech. pro mikrobiologickou diagnostiku, část 8, Labor Aktuell, str. 17-20 <http://www.roche-diagnostics.cz/la/odborne.asp>, duben 2008
- [13] Pavlík E., Mol. biol. tech. pro mikrobiologickou diagnostiku, část 7, Labor Aktuell, str. str.13-14 <http://www.roche-diagnostics.cz/la/odborne.asp>, duben 2008
- [14] Priglová M.,König J.:Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2002, 11(2), str. 82-86
- [15] Žůrek D., Bull, Kvantitativní real-time PCR, Čes. spol. mikrobiol., Roč 45, č.1 (2004), str. 16-25

- [16] Pavlík E., Mol. biol. tech. pro mikrobiologickou diagnostiku, část 11, Labor Aktuell 03/04, str.10-13
- [17] Pavlíková A., Molekulárně biologické techniky v dg. infekčních nemocí a jejich význam v praxi, ÚBAP, FNKV Praha
- [18] Šumpelová M., přírodovědecká fakulta UK v Praze 2007, bakalářská práce, str. 19
- [19] Pavlík E., Mol. biol. tech. pro mikrobiologickou diagnostiku, část 5, Labor Aktuell, str.20-23 <http://www.roche-diagnostics.cz/la/odborne.asp>, duben 2008
- [20] [www.nemstbk.cz/olm/pristroje/genom.htm](http://www.nemstbk.cz/olm/pristroje/genom.htm), duben 2008
- [21] Žůrek D., Labor Aktuell 01/05, str. 18-20
- [22] Novotný D., Molekulárně biologické vyšetřování patogenních nukleových kyselin, Labor Aktuell 04/02, str.8-10
- [23] Bednář M. a kolektiv, Lékařská mikrobiologie, Marvil 1996, Fraňková V., RNA viry, str. 466-467
- [24] COBAS AMPLICOR Hepatitis C virus Test, návod
- [25] Bednář M. a kolektiv, Lékařská mikrobiologie, Marvil 1996, Fraňková V., DNA viry, str. 411
- [26] Jindra P., Koza V.,Cetkovský P., Hájek P., Švecová M., Monitorace aktivity cytomegalovirové infekce u nemocných po alogenní transplantaci kostní dřeně metodou dvoustupňové "nested" PCR, Vnitřní lékařství, 44, 1998,č.6,str .350-354
- [27] Psohlavec J.,Förstl M.,Horáček J.,Plíšková L., Veselský Z.,Fixa P.,Možnosti rychlého průkazu Ganciclovir rezistentních kmenů lidského cytomegaloviru (HCMV,CMV) u pacientů po transplantaci ledviny. Detekce bodových mutací v UL 97 genu HCMV spojených s rezistencí vůči Gancicloviru, Klin. Farmakol., roč.18,č.2 (2004), str. 70-74
- [28] Förstl M., Neumann D., Štěpánová V., Mlynář J., Plíšková L., Fajfr M., Šplího M.,Chlamydia trachomatis: aktuální pohled, možnosti a limity přímé diagnostiky, Pediatr. pro praxi, roč. 5, č. 4 , (2004) , str. 198-200
- [29] Šimko J., Langšandl L., Jarčuška P., Chlamydiové infekcie urogenitálního traktu - ich klinické prejavy, diagostika a možnosti terapie, [www.roche-diagnostics.cz/la/odborne.asp](http://www.roche-diagnostics.cz/la/odborne.asp), březen 2008



- [30] Pavlík E., Křemen J., Stříbrná J., Zákoucká H., Knappová M., Real-time PCR Testy pro detekci *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* v kli. vzorcích s využitím LightCycleru Roche, Labor Aktuell CS, č.1 (2004), str. 10-15
- [31] COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Test (s.2)
- [32] Pavlík E., Mol. biol. techniky pro mikr. dg. č. 4., Labor Aktuell 3, r.1999, str.14-17
- [33] Zemanová V., Pavlík E., Inhibitory DNA - polymerasy v biologických vzorcích vyšetřovaných na přítomnost *Chlamydia trachomatis* metodou PCR a možnosti jejich eliminace, Labor Aktuell 04/02, str.4-7
- [34] Pavlík E., Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku, část 12, Labor Aktuell 04/04, str.10-13
- [35] [html.rincondelvago.com/files/1/5/0/0004315011.png](http://html.rincondelvago.com/files/1/5/0/0004315011.png) , duben 2008
- [36] DIAGNOSTICKÉ TECHNIKY- kurzIPVZ.ppt [36], březen 2008
- [37] [http://www.roche.de/diagnostics/zoom.htm?/diagnostics/labor/images\\_tuerkis/magna\\_b2\\_gr\\_jpg](http://www.roche.de/diagnostics/zoom.htm?/diagnostics/labor/images_tuerkis/magna_b2_gr_jpg), duben 2008
- [38] [http://www.rochediagnostics.es/images/02\\_produc\\_serv/020206020601\\_01.jpg](http://www.rochediagnostics.es/images/02_produc_serv/020206020601_01.jpg), duben 2008
- [39] [http://www.roche-applied-science.com/sis/lightcycler/images/lc2/LC\\_GUTS.JPG](http://www.roche-applied-science.com/sis/lightcycler/images/lc2/LC_GUTS.JPG), duben 2008
- [40] [http://www.diginfo.tv/archives/roche\\_st300.jpg](http://www.diginfo.tv/archives/roche_st300.jpg) [28], duben 2008
- [41] <http://www2.cmu.edu.tw/~cmcrdc/LMPC.h8.gif> , duben 2008

## Použité zkratky

ATP	adenosin-trifosfát
BAL	bronchoalveolární laváž
BIOMOL	laboratoř molekulárně biologických metod
C-G	cytosin-guanin
Cp	crossing point
CMV	Cytomegalovirus
A-T	adenin-tymin
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
cDNA	copy DNA
dsDNA	dvouřetězová deoxyribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dUTP	deoxyuridin-trifosfát
dTTP	deoxythymidin-trifosfát
ET	elementární tělíčko
EBV	virus Epsteinova a Barrova
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
FRET	Foerstrův rezonanční přenos energie
HAV	virus hepatitidy A
HBV	virus hepatitidy B
HCV	virus hepatitidy C
HIV	human immunodeficiency viruses
HSV	<i>Herpes virus simplex</i>
LCR	ligázová řetězová reakce
MAV	<i>Mycobacterium avium</i>
MIN	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NK	nukleová kyselina
PA	nosič větveného zesilovacího multimeru

q-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
RT	retikulární tělísko
RT-PCR	reverzně transkripční PCR
SDA	amplifikace založená na přemístování řetězce
ssDNA	jednořetězová deoxyribonukleová kyselina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TMA	amplifikace řízená transkripcí
TMB	3,3',5,5' - tetrametylbenzidin
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
ÚBAP	Ústav biochemie a pathobiochemie
VZM	větvený zesilovací multimer