

Úloha č. 6

Izolace DNA z moče a RealTime PCR diagnostika ureaplasmy

Ureaplasma kolonizuje spodní část urogenitálního traktu u mnoha zdravých osob, na druhou stranu může také způsobovat uretritidy, endometritidy, chorioamnionitidy, spontánní potraty, artritidy, močové kameny, bakteriémie a meningitidy a také nízkou porodní váhu.

Ureaplasma urealyticum je bakterie patřící do čeledi *Mycoplasmataceae*. *U. urealyticum* se dělí na 14 sérovarů, které mohou být dále členěny na dva biovary, biovar 1 and biovar 2, a to na základě genotypizace. Biovar 1 zahrnuje 4 sérovary (sérovary 1, 3, 6 a 14), zatímco biovar 2 zahrnuje deset sérovarů (sérovary 2, 4, 5 a 7–13). Druhy do současnosti známé jako *U. urealyticum* by měly být rozděleny na dva druhy, *U. parvum* (dříve *U. urealyticum* biovar 1) a *U. urealyticum* (dříve *U. urealyticum* biovar 2). Většinu izolátů *Ureaplasma* lidského původu patří do nového druhu *U. parvum*. *U. urealyticum* (biovar 2) je izolována méně často.

Ureaplasma sp. je u mužů hlavním původcem negonokokových a nechlamydiálních uretritid, akutních prostatitid a získaných artritid. U těhotných a netěhotných žen *Ureaplasma* (oba druhy) může způsobovat chorioamnionitidu, předčasný porod, potrat, vaginitidy a cervicitidy. Klinické studie potvrdily, že děti narozené infikovaným matkám bývají touto bakterií také infikovány a mívají kolonizován dýchací trakt, což je posléze asociováno s pneumoniemi, problémy s dýcháním a meningitidami.

Postup práce:

Odběr vzorku

Vzorek odebírejte do sterilních zkumavek. Používejte čisté sterilní zkumavky bez konzervačních přísad. Vzorky moči je nutno uchovávat a přepravovat při 4 °C. Vzorky je možné při 4 °C uchovávat až 7 dní.

Postup izolace DNA:

Po celou dobu používejte ochranné rukavice!

1. Do připravených 1,5 ml mikrozkušavek **napipetujte 200 µl sedimentu z moče rozsuspendovaného v PCR vodě, 200 µl roztoku B1, 20 µl proteinázy K a 20 µl IC DNA 01.**
2. Mikrozkušavky vložte do termotřepačky vytemperované na 65°C a inkubujte 20 min. Poté mikrozkušavky krátce stočte na centrifuze.
3. Ke každému lyzátu **přidejte 200 µl roztoku B2.** Jemně zvertexujte a zcentrifugujte.
4. Přeneste veškerý obsah mikrozkušavky do kolonky.
5. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.

6. Přendejte kolonku do nové mikrozkušavky.
7. **Do kolonky přidejte 500 µl roztoku B3.**
8. Centrifugujte 30 sekund při 14 000 x g.
9. Vyjměte kolonku z mikrozkušavky, obsah mikrozkušavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
10. **Do kolonky přidejte 500 µl roztoku B4.**
11. Centrifugujte 30 sekund při 14 000 x g .
12. Vyjměte kolonku z mikrozkušavky, obsah mikrozkušavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
13. Znovu centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
14. **Opatrně vyjměte kolonku a přeneste ji do nové mikrozkušavky, aniž byste se dotkli roztoku B4 na dně původní mikrozkušavky.**
15. **Roztok B5 inkubujte asi 5 minut na termotřepačce při 65°C. Do středu kolonky napipetujte 50 µl roztoku B5 předehřátého na 65°C.**
16. Centrifugujte 1 min při 14 000 x g.
17. Odstraňte kolonku a zavřete víčko mikrozkušavky. Izolovaná DNA je nyní připravena pro různé aplikace.

Příprava vzorku pro RealTime PCR – LC480 (Roche)

1. Vezměte jednu zkumavku s UREAPLASMA UNI Mixem a po rozmrazení ji řádně zvortexujte.
2. Přidejte 15 µl mixu do amplifikační destičky/stripu.
3. Přidejte 5 µl izolované DNA. Během pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili vzájemné kontaminaci vzorků.

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 - Hold

95°C 3 min Ramp rate (5°C/s)

Step 2 – 3-Step Amplification, 50 cycles

95°C 5 s Ramp rate (5°C/s)

55°C 20 s Ramp rate (4°C/s) “Acquire” signal

72°C 10 s Ramp rate (5°C/s)

Step 3 - Hold

40°C 1 min Ramp rate (4°C/s)

Interpretace výsledků

Negativní výsledek

Pokud nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM před 50. cyklem, lze výsledek interpretovat jako pravděpodobně *Ureaplasma urealyticum* a/nebo *Ureaplasma parvum* negativní nebo koncentrace *Ureaplasma urealyticum* a *Ureaplasma parvum* je pod detekčním limitem soupravy (10 genomových DNA/reakci). Signál pro interní kontrolu musí být pozitivní. Výsledek nevylučuje přítomnost *Ureaplasma urealyticum* a *Ureaplasma parvum* infekce, protože výsledky testu jsou závislé na správném odběru vzorku a jeho zpracování.

Výsledky jsou též závislé na přítomnosti dostatečného množství analyzované DNA *Ureaplasma urealyticum* a *Ureaplasma parvum*.

Pozitivní výsledek

Amplifikační signál v FAM kanálu se objeví před 45. cyklem. *Ureaplasma urealyticum* a/nebo *Ureaplasma parvum* DNA byla detekována ve vzorku. Vzorek je *Ureaplasma urealyticum* a *Ureaplasma parvum* DNA pozitivní.

Upozornění: Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící DNA analýzy.

Inhibovaný vzorek

V případě, že nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM (specifického pro DNA *Ureaplasma urealyticum* a *Ureaplasma parvum*) a ani k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu HEX (specifického pro interní kontrolu), je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky DNA.