

Zmluva o spolupráci

uzatvorená v zmysle ust. §24 zákona. 576/2004 Z.z. (ďalej len "Zmluva")

Čl.1

Zmluvné strany

Žiadateľ o spoluprácu (ďalej len žiadateľ)

Univerzita Komenského v Bratislave

Sídlo: Šafárikovo nám. 6, P.O.BOX 440, 814 99 Bratislava 1

Zastúpená: prof. JUDr. Marek Števček, DrSc. rektor UK

IČO: 00397865

DIČ: 2020845332

IČ DPH: SK2020845332

Univerzita Komenského v Bratislave - Prírodovedecká fakulta

Sídlo: Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4

Zastúpená: prof. RNDr. Peter Fedor, DrSc, dekan fakulty

Právna forma: Verejnoprávna inštitúcia zriadená zákonom č. 131/2002 Z.z. o vysokých školách ako verejná vysoká škola

Pracovisko : katedra biochémie

Osoba oprávnená konať vo veciach technických: Ing. Pavol Sulo CSc

Telefón :

E-mail :

IČO: 00397865

DIČ: 2020845332

IČ DPH: SK2020845332

Bankové spojenie:

IBAN:

SEPA STEP2/SWIFT/BIC:

TARGET2/SWIFT/BIC:

SWIFT/BIC:

Poskytovateľ spolupráce vzoriek údajov (ďalej len poskytovateľ)

Národný ústav tuberkulózy pľúcnych chorôb a hrudníkovej chirurgie Vyšné Hágy

so sídlom: 059 84 Vyšné Hágy 23001

právna forma: štátna príspevková organizácia zriadená Ministerstvom zdravotníctva SR

zastúpený: Ing Slavko Rodák, riaditeľ

IČO: 00227811

IČ DPH: 2021212622

SK2021212622

Čl. II.

Predmet zmluvy

Predmetom zmluvy je spolupráca na projekte biomedicínskeho výskumu „Diferenciálna DNA diagnostika mykobaktérií – M. tuberculosis“ (ďalej len „projekt“ alebo „štúdia“), ktorého zámerom je preveriť súvislosť výskytu mykobakteriálnej DNA v stolici s výsledkami imunologických testov na tuberkulózu (IGRA, QuantiFERON TB). Protokol štúdie tvorí neoddeliteľnú súčasť tejto zmluvy ako Príloha č. 1. Problém bude riešený v rámci projektu APVV-23-0520 Inovatívny skrining rakoviny pľúc pomocou genomickej analýzy kondenzátu vydychovaného vzduchu podporený modelom strojového učenia. Druhým zámerom projektu je porovnať výsledky komerčných testov s nedávno vyvinutými „nested PCR“ testami na identifikáciu prítomnosti mykobaktérií a Mycobacterium tuberculosis a sekvenovaním DNA.

Čl. III.

Spôsob spolupráce

1. Poskytovateľ sa zaväzuje bezplatne poskytnúť žiadateľovi v období od účinnosti tejto zmluvy do 30.6.2026 minimálne 50 (slovom: päťdesiat) vzoriek stolice pacientov, ktorí sú na biologickej liečbe a budú súhlasiť s účasťou na štúdiu. Zároveň sa poskytovateľ zaväzuje poskytnúť žiadateľovi detailné výsledky testov QuantiFERON TB Gold Plus. Vzorky bude uchovávať v mrazničke Philco na -20°C, ktorú zapožičia žiadateľ. Poskytovateľ sa zároveň zaväzuje poskytnúť vzorky eluátu DNA 50 pacientov vyšetrovaných na tuberkulózu. Vzorky budú taktiež uchovávané v mrazničke na -20°C.
2. Žiadateľ sa zaväzuje prevziať vzorky od poskytovateľa v intervale dvoch týždňov a transportovať ich na pracovisko na vlastné náklady. Tiež sa zaväzuje vypracovať informovaný súhlas a získať schválenie projektu Etickou komisiou PRIFUK. Schválený formulár informovaného súhlasu dá k dispozícii poskytovateľovi.
3. Žiadateľ sa zaväzuje bezplatne poskytnúť poskytovateľovi na účely výkonu činnosti podľa Čl. II, Čl. III tejto zmluvy nasledovný špeciálny zdravotnícky materiál:
Špičky, odberné nádoby na stolicu, mrazničku Philco 80 l, iný prebytočný laboratórny materiál a chemikálie podľa dohody.

Čl. IV.

Dôvernosť, mlčanlivosť, ochrana osobných údajov

1. Pri vykonávaní tohto projektu biomedicínskeho výskumu sa materiál a údaje pacienta/dobrovoľníkov, ako sú definované v Prílohe č. 2 tejto zmluvy, prenesú žiadateľovi v súlade s podmienkami stanovenými v tejto zmluve a v Prílohe č. 2 tejto zmluvy.
2. Zmluvné strany uznávajú spoločný cieľ zabezpečiť všetky osobné údaje a zachovávať dôvernosť týchto informácií a chrániť ich pred neoprávneným zverejnením.
3. Poskytovateľ poskytne osobné údaje žiadateľovi iba v pseudonymizovanej forme. Vo všetkých prípadoch zverejnenia bude poskytovateľ rešpektovať princíp „minimalizácie údajov“ na ochranu osobných údajov, okrem iného aj to, že akékoľvek údaje účastníkov sa vždy pseudonymizujú a skutočné mená účastníkov skúšania sa nebudú uvádzať na žiadnych vzorkách tkaniva, ani na inej dokumentácii.
4. Každá zmluvná strana zaručuje, že prijme technické a organizačné opatrenia proti neoprávnenému alebo nezákonnému spracovaniu, náhodnej strate, zničeniu a/alebo poškodeniu osobných údajov od druhej zmluvnej strany.
5. Žiadateľ preberá všetku zodpovednosť za škodu a zaväzuje sa odškodniť a zbaviť zodpovednosti poskytovateľa za akékoľvek straty alebo škody vyplývajúce z nárokov tretích strán vyplývajúcich alebo súvisiacich s plnením povinností podľa tejto zmluvy.
6. Zmluvné strany si sú vedomé rizika úspechu alebo zlyhania spojeného s výskumom podľa tejto zmluvy. S ohľadom na výskumný charakter výskumu podľa tejto zmluvy neposkytuje poskytovateľ žiadne záruky týkajúce sa dosiahnutia akéhokoľvek konkrétneho výsledku. Neexistujú žiadne výslovné ani implicitné záruky predajnosti alebo vhodnosti na konkrétny účel pre ktorýkoľvek z výsledkov skúšania, ani to, že použitie výsledkov skúšania neporuší žiadne patentové práva tretej strany.
7. Zmluvné strany sa zaväzujú, že informácie podľa tejto zmluvy neoznámia ani inak nesprístupnia tretím osobám, nezverejnia, ani nepoužijú inak, ako na účely plnenia svojich záväzkov a výkonu svojich práv podľa tejto zmluvy. Povinnosť mlčanlivosti podľa tohto článku trvá aj po skončení tejto zmluvy bez časového obmedzenia.
8. Vyššie uvedené povinnosti sa nevzťahujú na povinnosť poskytnúť chránené údaje a dôverné informácie orgánom verejnej správy na základe zákona alebo právoplatného rozhodnutia súdu alebo iného orgánu verejnej správy. Takúto skutočnosť povinná zmluvná strana neodkladne písomne oznámi druhej zmluvnej strane. Zmluvná strana, ktorá má takto dôverné informácie poskytnúť, je však povinná využiť všetky existujúce prostriedky v súlade s právnymi predpismi na odmietnutie alebo obmedzenie oznámenia a sprístupnenia dôverných informácií.
9. Žiadateľ súhlasí s tým, že Poskytovateľ zverejní túto zmluvu, jej dodatky v Centrálnom registri zmlúv vedenom Úradom vlády Slovenskej republiky v súlade so zákonom č. 546/2010 Z. z., ktorým sa dopĺňa zákon č. 40/1964 Zb. Občiansky zákonník v znení neskorších predpisov a ktorým sa menia a dopĺňajú niektoré zákony.
10. Každá zmluvná strana zodpovedá druhej zmluvnej strane za škodu spôsobenú porušením povinnosti mlčanlivosti

Čl.V.

Výsledky spolupráce.

1. Poskytovateľ je povinný poskytnúť žiadateľovi všetky údaje potrebné na vypracovanie publikácie, kde budú zverejnené výsledky spoločného projektu s výnimkou osobných údajov podľa Čl. IV tejto zmluvy.
2. Žiadateľ sa zaväzuje, že výsledky spolupráce bude publikovať do roka od ukončenia experimentálnej práce v rešpektovaných časopisoch s „Impact factorom“ v quartile 1 alebo 2, pričom text zverejnenia je povinný zaslať Poskytovateľovi vopred ešte pred zverejnením na účely pripomienkovania.
3. Žiadateľ sa zaväzuje uviesť v publikácii ako autorov osoby spolupracujúce významnou mierou na projekte zamestnané v Národnom ústave tuberkulózy, pľúcnych chorôb a hrudníkovej chirurgie Vyšné Hágy (u poskytovateľa).
4. Žiadateľ súhlasí s dodatočným vyžiadaním súhlasu EK Poskytovateľa pri akejkolvek zmene projektu a so zasielaním správy 1x ročne aj pre EK Poskytovateľa.

Čl.V.

Doba platnosti zmluvy

1. Zmluva sa uzatvára na dobu určitú podľa Čl. III bod 1 tejto zmluvy.
2. Platnosť zmluvy môže byť ukončená:
 - a) uplynutím doby na ktorú bola uzatvorená
 - b) písomnou dohodou zmluvných strán
 - c) písomnou výpoveďou ktorejkoľvek zmluvnej strany aj bez uvedenia dôvodu s výpovednou dobou 1 mesiac, ktorá začína plynúť kalendárnym mesiacom, ktorý nasleduje po mesiaci, v ktorom bola písomná výpoveď doručená druhej zmluvnej strane
 - d) odstúpením od zmluvy zo strany Poskytovateľa v prípade, ak Žiadateľ neplní povinnosti podľa tejto zmluvy alebo projektu. Odstúpenie je účinné dňom doručenia písomného prejavu vôle druhej zmluvnej strane.

Čl. VI.

Záverečné ustanovenia

1. Zmluvné strany dohodli zákaz postúpenia pohľadávok zmluvnej strany podľa § 524 a nasl. zákona č. 40/1964 Zb. Občiansky zákonník v znení neskorších predpisov (ďalej len „Občiansky zákonník“) bez predchádzajúceho písomného súhlasu druhej zmluvnej strany. Právny úkon, ktorým budú postúpené pohľadávky zmluvnej strany v rozpore s dohodou podľa predchádzajúcej vety, bude podľa § 39 Občianskeho zákonníka absolútne neplatný. Súhlas dlžníka je zároveň platný len za podmienky, že bol na takýto úkon udelený predchádzajúci písomný súhlas MZ SR.

2. Vzťahy neupravené touto zmluvou sa riadia príslušnými ustanoveniami zákona č. 40/1964 Zb. Občiansky zákonník v znení neskorších predpisov, príslušnými ustanoveniami zákona č. 513/1991 Z.z. Obchodný zákonník v znení neskorších predpisov, ako aj ustanoveniami zákona č. 576/2004 Z.z. v znení neskorších predpisov.
3. Zmluvu možno meniť len na základe vzájomnej dohody oboch Zmluvných strán, a to vo forme písomných dodatkov k Zmluve, očíslovaných podľa poradia ich prijatia a podpísaných oprávnenými zástupcami oboch zmluvných strán.
4. Zmluva je vyhotovená v štyroch rovnopisoch, pre každú Zmluvnú stranu sú určené dva jej rovnopisy.
5. Táto Zmluva nadobúda platnosť jej podpísaním oboma Zmluvnými stranami a účinnosť dňom podľa čl. III bod 1 tejto Zmluvy v súlade s ust. § 47a ods. 2 zákona č. 40/1964 Zb. Občiansky zákonník v znení neskorších predpisov. Zmluvné strany súhlasia s tým, že táto zmluva bude zverejnená v Centrálnom registri zmlúv vedenom Úradom vlády SR podľa zákona č. 211/2000 Z.z. o slobodnom prístupe k informáciám a o zmene a doplnení niektorých zákonov (zákon o slobode informácií) v znení neskorších predpisov.
6. Zmluvné strany vyhlasujú, že si zmluvu pred podpisom prečítali, že bola uzatvorená na základe vzájomnej dohody, podľa ich pravej a slobodnej vôle, určite, vážne a zrozumiteľne, nie v tiesni, ani za nápadne nevýhodných podmienok, na znak čoho vlastnoručne podpisujú.

Vo Vyšných Hágoch, dňa

Za poskytovateľa:

Ing. Slavko Rodák

riaditeľ

V Bratislave dňa

Za žiadateľa

prof. RNDr. Peter Fedor, DrSc,

dekan fakulty

Projekt

Diferenciálna dna diagnostika mykobaktérií – *M. tuberculosis*

Tuberkulózu (TBC), infekčné ochorenie najčastejšie pľúc, spôsobujú baktérie komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)(1-3). Ročne sa nakazí viac ako 10 miliónov ľudí, pričom, bez liečby je úmrtnosť vysoká asi (asi 50 %) ale pri včasnej liečbe sa vylieči až 85% infikovaných (2). V rozvinutých krajinách je vyššia prevalencia iba u ľudí s nedostatočnou starostlivosťou, chudobných ľudí a bezdomovcov, a všeobecne u ľudí, ktorí sa s nimi dostávajú do kontaktu (2,3). Ochorenie sa môže vyskytovať v aktívnej i latentnej forme.

Pre aktívnu formu je typický dlhodobý dráždivý kašeľ, nález na pľúcach, ktorý sa dá dobre rozoznať na röntgenovom snímku. Za jednoznačný dôkaz ochorenia (definitívny prípad) je považovaná kultivácia mykobaktérií (1-4).

Pri latentnej forme sa ochorenie neprejavuje. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) definuje latentnú tuberkulóznú infekciu (LTBI) ako stav perzistujúcej imunitnej odpovede stimulovanou antigénmi Mtb s absenciou klinických príznakov a dôkazov aktívnej TBC (5-8). WHO odhaduje, že takto môže byť infikovaných okolo 2 miliárd ľudí. Riziko progresie do klinického ochorenia súvisí s oslabením imunity, najmä v súvislosti s infekciou HIV (5-9). LTBI sa niekedy označuje aj termínom „infekcia TBC“ (7,10). WHO dokonca odporúča preventívnu antibiotickú liečbu ak sa jedná o „ohrozených“ jedincov (oslabená imunita, kontakt s HIV pozitívnymi či tuberkulóznymi pacientmi atď.) (7,10).

Na diagnostiku TBC sa štandardne používajú dva typy imunologických testov, tuberkulínový kožný test (TST) alebo testy IGRA (z ang. Interferon Gamma Release Assays) (1,11). Tuberkulínový test sa nedá použiť v očkovanej populácii, pretože klasifikuje aj očkovaných ako pozitívnych (1,11). Preto sa LTBI diagnostikuje výlučne pomocou IGRA testov (QuantiFERON TB Gold (QFT)). Sú založené na uvoľnení interferónu γ z T lymfocytov v prítomnosti antigénov ESAT-6 (z ang. *early secretory antigenic target-6*) a CFP-10 (z ang. *culture filtrate protein-10*), ktoré sú špecifické pre *M. tuberculosis* (1,11,12). Oba antigény nie sú prítomné v oslabených inaktivovaných kmeňoch *M. bovis* (používaných pri vakcinácii) a ako tvrdia niektorí autori aj vo väčšine netuberkulózných mykobaktérií (NTM). Výnimkou sú *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, a *M. leprae* (1,11,12).

Dôkazy o existencii latentnej formy sú veľmi skromné. Jediná práca popisuje výskyt buniek Mtb v krvných kmeňových bunkách LTBI jedincov a aj u myši ako modelu LTBI. Nedajú sa však kultivovať na miskách s agarom ale začnú sa replikovať iba ak sú injikované infikované CD34+ bunky do trachei imonodeficientných myši (13).

Lepším prístupom k diagnostike LTBI by bol vývoj testu na detekciu samotného Mtb a nie imunitná odpoveď hostiteľa. Dobrým markerom sú Mtb špecifické proteíny, ale najmä DNA, ktorá sa dá amplifikovať pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). V tomto smere nádejne vyznievala najmä digitálna kvapková PCR (ddPCR) (z ang. *droplet digital*) (10,14-16). Rôzne varianty PCR boli použité na preukázanie prítomnosti Mtb DNA v exozomálnej DNA, voľnej DNA, v krvi a moči alebo mononukleárných bunkách periférnej krvi (10,15-22). Avšak nepodarilo sa preukázať rozdiely medzi QuantiFERON pozitívnymi a negatívnymi jedincami (18-22). Naviac slabinou týchto prác bolo, že nebola preverená špecificita amplifikácií sekvenovaním. Preto sa PCR prístupy v diagnostike TBC takmer nepoužívajú. Svetová zdravotnícka organizácia odporúča test GeneXpert MTB/RIF (Xpert), (1,2,23). Test je rýchly, využíva automatizovanú izoláciu DNA a je založený na princípe real-time PCR, Citlivosť je 5 kópií DNA na reakciu resp. 131 KTJ/ml (2,19). Táto citlivosť postačuje na preukázanie akútnej infekcie, ale nie pre identifikáciu latentnej formy. Detekcia založená na „nested PCR“ je vyžívaná iba sporadicky a zatiaľ sa nepresadila (24). Zvýšenie citlivosti sa dá dosiahnuť obohatením vzorky o terčové molekuly pomocou hybridizácie a amplifikácie krátkych fragmentov (40 bp) na 5 kópií na 10 ml moču (25).

Ak tieto poznatky zhrniem podľa WHO je LTBI spôsobená prežívaním dormantných foriem Mtb v pľúcach, či v mononukleárných bunkách z periférnej krvi hostiteľa. Prítomnosť patogénu je diagnostikovaná výlučne na základe reakcie imunitného systému na prítomnosť Mtb špecifických antigénov pomocou IGRA testov. Aj napriek značnej snahe sa nepodarilo dosiaľ preukázať prítomnosť Mtb (buniek, DNA, proteínov).

V našom laboratóriu sa už dlhší čas zaoberáme identifikáciou patogénov a vývojom extrémne citlivých „nested PCR“ testov“ (26-29). Ukázalo sa, že okrem potvrdených ľudských patogénov *Helicobacter pylori* či *Chlamydia pneumoniae* dochádza k infekcii príbuznými druhmi. Pre diagnostiku *Mycobacterium tuberculosis* sme vypracovali a validovali druhovo špecifický test založený na amplifikácii úseku inzerčného elementu IS6110, ktorý sa vyskytuje iba v druhoch komplexu Mtb. Okrem toho sme vyvinuli rodovo špecifické testy pre všetky mykobaktérie založené na amplifikácii variabilných úsekov 16S rRNA génu. Špecificita testov bola preverená sekvenovaním PCR produktov. S ich pomocou sme preverili viac než 200 vzoriek (30-32). Napriek extrémnej citlivosti (1 molekula templátu v reakcii) sme v pľúcach, spúte a v krvi našli iba sporadicky krátke fragmenty netuberkulózne (NTM) DNA a Mtb DNA iba v prípadoch s diagnostikovanou akútnou formou TBC. Dlhšie úseky NTM DNA sa dali amplifikovať ale z 20 % vzoriek stolice, čo poukazuje na osídlenie tráviaceho traktu mykobaktériami, zrejme hrubého čreva. Sekvenovaním PCR produktov sa potvrdila

prítomnosť širokého spektra NTM, najčastejšie rýchlorastúcich druhov z komplexov *M. abscessus*, *M. neoaurum* a *M. goodii*. Bioinformatickou analýzou a z literatúry sme identifikovali homológy antigénov ESAT-6 a CFP-10, u väčšiny identifikovaných NTM (32). Ako už bolo spomínané na identifikácii týchto antigénov sú založené IGRA testy (QuantiFERON TB Gold (QFT) i diagnostika LTBI. Preto prítomnosť NTM v tráviacom trakte by mohla byť vysvetlením pozitívnych výsledkov imunologických IGRA testov a fenoménu latentnej tuberkulózne infekcie.

Je teda otázne, či pozitívny výsledok testu QuantiFERON TB súvisí s perzistenciou samotného *Mycobacterium tuberculosis*, alebo je to dôsledok prítomnosti netuberkulózných mykobaktérií.

Preto primárnym zámerom predkladaného projektu, je preveriť výskyt mykobakteriálnej DNA u jedincov testovaných imunologickým testom na tuberkulózu (IGRA, QuantiFERON TB) v stolici. Bude treba pretestovať súbor aspoň 50 jedincov. Tu sa ponúkajú dve možnosti. Pretestovať výskyt NTM u pacientov NÚTPCHaHCH, takých u ktorých nebola diagnostikovaná akútna forma TBC, ale majú pozitívne QuantiFERON TB testy. Pracovníci NÚTPCHaHCH budú zberať stolicu pacientov, ktorí sú na biologickej liečbe a budú súhlasiť s účasťou na štúdiu. Vzorky budú skladované pri -20°C v mrazničke a v pravidelných intervaloch vyzdvihnuté a priebežne analyzované. Vzorky a záznamy sa budú spracovávať v zakódovanej podobe HS a náhodne vybrané číslo napr. HS0526 pre vzorky stolice. Výsledkom by mala byť publikácia v rešpektovanom časopise. Ak začneme hneď tak by mohla byť zaslaná do redakcie v jeseni 2025. Slabinou tohto projektu je, že sa jedná o chorých ľudí. Preto by bolo vhodné preveriť dobrovoľníkov, ktorých sme už testovali (32). Mnohí sú ochotní zcestovať do Vyšných Hágov a dať si spraviť QuantiFERON TB test. Alternatívne máme dohodu s Medirexom, kde budú QuantiFERON TB testom analyzované vzorky dobrovoľníkov, ktorí už majú známe výsledky „nested“NPCR zo stolice. Aj tu by bolo vhodné aby sa pretestovalo aspoň 100 dobrovoľníkov.

Druhým zámerom je porovnanie výsledkov komerčných testov, založených na analýze DNA, ktoré sa používajú na NÚTPCHaHCH s našimi nedávno vyvinutými „nested PCR“ testami, kde ako interná kontrola slúži sekvenovanie DNA. Bude treba pretestovať súbor aspoň 50 jedincov. DNA izolujú na Oddelení klinickej mikrobiológie pomocou izolátora Biosan- BioMagPure a MPure TB DNA Extraction Kitu. DNA potom využívajú na multiplex PCR pre dôkaz MTB/netuberkulózných mykobaktérií/ MAC(*M. avium* komplex) vo vzorkách, či identifikáciu mykobaktérií. Sekvenovanie by mohlo priniesť viac

svetla najmä do sporných vzoriek. DNA izolovaná na NÚTPCHaHCH, bude analyzovaná na PRIFUK rodovo i druhovo špecifickou „nested PCR“ na prítomnosť *Mtb* i NTM a sekvenovaním amplikónov, tak ako je to popísané v Senko (2024;32). Tu by mal byť tiež výstup publikácia. Všetky vzorky a záznamy sa budú spracovávať v zakódovanej podobe HD a náhodne vybrané číslo napr. HD0526 pre vzorky pre vzorky DNA.

Zámery sú súčasťou APVV grantu APVV-23-0520. Inovatívny skrining rakoviny pľúc pomocou genomickej analýzy kondenzátu vydychovaného vzduchu podporenej modelom strojového učenia.

Literatúra

1. Solovič, et al., 2020, Tuberkulóza pľúc, štandardný postup 0110, 2020, Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky, (Dostupné na https://www.health.gov.sk/Zdroje?/Sources/dokumenty/SDTP/standardy/1-6-2020/110_PF_Tuberkuloza_pluc.pdf)
2. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO; (Dostupné na <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023> June 17, 2024)
3. Alsayed, S.S.R.; Gunosewoyo, H. Tuberculosis: Pathogenesis, Current Treatment Regimens and New Drug Targets. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 5202. <https://doi.org/10.3390/ijms24065202>
4. Huang, Y.; Ai, L.; Wang, X.; Sun, Z.; Wang, F. Review and Updates on the Diagnosis of Tuberculosis. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 5826. <https://doi.org/10.3390/jcm11195826>
5. Price C, Nguyen AD. Latent Tuberculosis. 2024 Jan 11. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 38261712.
6. Latent tuberculosis infection: updated and consolidated guidelines for programmatic management. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO..0 IGO. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550239> <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061729> (accessed on 19 July 2024).
7. Kunin M, Timlin M, Lemoh C, Sheffield DA, Russo A, Hazara S, McBride J. Improving screening and management of latent tuberculosis infection: development and evaluation of latent tuberculosis infection primary care model. *BMC Infect Dis.* 2022 Jan 12;22(1):49. [PMC free article: PMC8756639] [PubMed: 35022023]
8. Migliori, G. B., Ong, C. W., Petrone, L., D'Ambrosio, L., Centis, R., & Goletti, D. (2021). The definition of tuberculosis infection based on the spectrum of tuberculosis disease. *Breathe*, 17(3).
9. Carranza, C., Pedraza-Sanchez, S., de Oyarzabal-Mendez, E. a Torres, M. (2020) Diagnosis for Latent Tuberculosis Infection: New Alternatives. *Frontiers in Immunology*, 11.
10. Alonzi, T., Repele, F., & Goletti, D. (2023). Research tests for the diagnosis of tuberculosis infection. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 23(9), 783-795.
11. Al-Zamel, F.A. (2009) Detection and diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7, 1099–1108.
12. Migliori, G. B., Wu, S. J., Matteelli, A., Zenner, D., Goletti, D., Ahmedov, S., ... & Ong, C. W. M. (2022). Clinical standards for the diagnosis, treatment and prevention of TB infection. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 26(3), 190-205.
13. Tornack J, Reece ST, Bauer WM, et al. Human and mouse hemato poietic stem cells are a depot for dormant mycobacterium tuberculosis. *Plos One*. 2017;12(1):e0169119. doi: 10.1371/journal.pone.0169119

14. Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., a kol. (2011) High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal Chem* **83**, 8604–8610.
15. Belay, M., Tulu, B., Younis, S., Jolliffe, D.A., Tayachew, D., Manwandu, H., Abozen, T., Tirfie, E.A., Tegegn, M., Zewude, A., Forrest, S., Mayito, J., Huggett, J.F., Jones, G.M., O’Sullivan, D.M., Martineau, H.M., Noursadeghi, M., Chandran, A., Harris, K.A., a kol. (2021) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in CD34-positive peripheral blood mononuclear cells of asymptomatic tuberculosis contacts: an observational study. *Lancet Microbe Elsevier Ltd*, 2, e267–e275.
17. Nyaruaba, R., Mwaliko, C., Kering, K. K., & Wei, H. (2019). Droplet digital PCR applications in the tuberculosis world. *Tuberculosis*, 117, 85-92.
18. Fernández-Carballo, B. L., Broger, T., Wyss, R., Banaei, N., & Denking, C. M. (2019). Toward the development of a circulating free DNA-based in vitro diagnostic test for infectious diseases: a review of evidence for tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 57(4), e01234-18.
19. Cho, S. M., Shin, S., Kim, Y., Song, W., Hong, S. G., Jeong, S. H., & Lee, K. A. (2020). A novel approach for tuberculosis diagnosis using exosomal DNA and droplet digital PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(7), 942-e1.
20. Oreskovic, A., Panpradist, N., Marangu, D., Ngwane, M. W., Magcaba, Z. P., Ngcobo, S., ... & Lutz, B. R. (2021). Diagnosing pulmonary tuberculosis by using sequence-specific purification of urine cell-free DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(8), e00074-21.
21. Pan S-W, Su W-J, Chan Y-J, Chuang F-Y, Feng J-Y, Chen Y-M (2021) *Mycobacterium tuberculosis*–derived circulating cell-free DNA in patients with pulmonary tuberculosis and persons with latent tuberculosis infection. *PLoS ONE* 16(6): e0253879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253879>.
22. Repele, F., Alonzi, T., Navarra, A., Farroni, C., Salmi, A., Cuzzi, G., ... & Goletti, D. (2024). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in CD34+ peripheral blood mononuclear cells of adults with tuberculosis infection and disease. *International Journal of Infectious Diseases*, 106999.
23. Lee HS , Kee SJ , Shin JH , Kwon YS , Chun S , Lee JH , et al. Xpert MTB/RIF assay as a substitute for smear microscopy in an intermediate-burden setting. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; 199 (6):784–94 .
24. da Cruz HL, de Albuquerque Montenegro, R, de Araujo Lima JF, et al. Evaluation of a nested-PCR for mycobacterium tuberculosis, detection in blood and urine samples. *Braz J Microbiol* 2011;42:321-9.
25. Oreskovic, A., Panpradist, N., Marangu, D., Ngwane, M. W., Magcaba, Z. P., Ngcobo, S., ... & Lutz, B. R. (2021). Diagnosing pulmonary tuberculosis by using sequence-specific purification of urine cell-free DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(8), e00074-21.
26. Šeligová, B., Lukáč, Ľ., Bábelová, M., Vávrová, S., & Sulo, P. (2020). Diagnostic reliability of nested PCR depends on the primer design and threshold abundance of *Helicobacter pylori* in biopsy, stool, and saliva samples. *Helicobacter*, 25(2), e12680.
27. Sulo, P., & Šipková, B. (2021). DNA diagnostics for reliable and universal identification of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 27(41), 7100.
28. Smolejová, M., Cihová, I., & Sulo, P. (2021). Reliable and Sensitive Nested PCR for the detection of *Chlamydia* in Sputum. *Microorganisms*, 9(5), 935.
29. Smolejová, M., Krčmáriková, J., Cihová, I., & Sulo, P. (2023). Are ELISA and PCR Discrepancies in the Identification of *Chlamydia pneumoniae* Caused by the Presence of “Chlamydia-Related Bacteria”? *Microorganisms*, 11(1), 187.
30. Čižmarová, K. (2022) DNA Diagnostika Mykobaktérií – *Mycobacterium tuberculosis*. Diplomová práca. Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta.

31. Smolejová, M. (2022) Detekcia dormantných foriem patogénov, ktoré by mohli byť primárnou príčinou chronických chorôb. Dizertačná práca, Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta.
32. Senko, E (2024) Diferenciálna dna diagnostika mykobaktérií – *M. tuberculosis*. Diplomová práca. Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta.

Príloha č. 2

PRENOS ĽUDSKÝCH MATERIÁLOV a OSOBNÝCH ÚDAJOV

Materiál: stolica, potenciálne spútum, DNA

Darca: Jednotlivec, ktorý súhlasí s použitím svojho materiálu v súvislosti s týmto biomedicínskym výskumom podpísaním formulára informovaného súhlasu.

Údaje: znamenajú nasledujúce pseudonymizované údaje darcov materiálu: vek, pohlavie výsledky QuantiFERON TB testu

Materiál a údaje budú poskytnuté žiadateľovi výlučne na použitie opísané vo formulári informovaného súhlasu podpísanom darcom a protokolom výskumu alebo na zatiaľ nešpecifikované budúce použitie za predpokladu, že darca poskytol príslušný široký informovaný súhlas a použitie materiálu a údajov je schválené kompetentnou etickou komisiou (ďalej len „účel“). Žiadateľ súhlasí s tým, že materiál a údaje sa nebudú používať u ľudí, na žiadne účely liečby ani na žiadne iné účely ako daný účel.

Údaje a materiál poskytne poskytovateľ žiadateľovi bez identifikačných údajov jednotlivcov darcu. Žiadateľ vyhlasuje a zaručuje, že ani materiál, ani údaje nebudú použité samostatne, ani v spojení s inými informáciami, v akomkoľvek úsilí o stanovenie individuálnych identít akéhokoľvek subjektu, z ktorého boli materiály/údaje odvodené.

Účastníci, od ktorých bol materiál a údaje odobraté, sa môžu rozhodnúť odvolať súhlas s používaním materiálu a údajov. V takom prípade poskytovateľ potom oznámi žiadateľovi o takom materiály/údajoch, pre ktoré bol odvolaný súhlas, a požiada žiadateľa, aby vzorky zničila, ak ešte neboli zničené. Žiadateľ okamžite zničí takýto materiál a údaje, ktoré boli poskytnuté, a poskytne poskytovateľovi potvrdenie, že materiál a údaje boli zničené.

Žiadateľ je zodpovedný za dodržiavanie všetkých platných právnych predpisov, nariadení a usmernení, ktoré sa vzťahujú na používanie, manipuláciu a uchovávanie materiálu a údajov od momentu, keď materiál a údaje dostanú od poskytovateľa. Žiadateľ získa všetky povolenia alebo iné schválenia požadované vládnymi orgánmi v súvislosti s prijímaním, manipuláciou, používaním a uchovávaním materiálu a údajov. Žiadateľ bude uchovávať materiál a údaje na bezpečnom mieste. Na žiadosť poskytovateľa žiadateľ zverejní kedykoľvek, kde sa materiál alebo údaje nachádzajú. Žiadateľ podnikne všetky príslušné kroky na zabezpečenie toho, aby materiál alebo údaje neboli prístupné tretím stranám.

Po dokončení výskumu žiadateľ ukončí používanie materiálu a vráti alebo zničí všetok zvyšný materiál a údaje do štyroch týždňov od dokončenia výskumu a poskytne potvrdenie, v ktorom sa uvádza, že materiál a údaje boli zničené, pokiaľ darca materiálu neposkytol rozsiahly informovaný súhlas s budúcim použitím materiálu a údajov. Na objasnenie uvádzame, že každé takéto použitie v budúcnosti musí byť povolené kompetentnou etickou