

RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI 2007



**17. a 18. ledna 2007
v prostorách hotelu Zlatá štika, Pardubice**

www.rank.cz

Oddělení klinické biochemie a diagnostiky
Krajská nemocnice Pardubice, Kyjevská 44, 532 03 Pardubice

PROGRAM
ODBORNÁ KONFERENCE

**RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI 2007**

17. a 18. ledna 2007
v prostorách hotelu Zlatá štika, Pardubice
odborný garant: Prof.MUDr. Tomáš Zima, DrSc.,MBA, ÚKBLD VFN Praha

17.ledna 2007 středa

10.00 – 13.00 **Registrace**

13.00 – 13.05 **Zahájení**

13.05 – 13.35 **Prezentace zúčastněných pracovišť**
Předsedající: Ing. F. Šturm, Mgr. J. Mrázek

Ing. F. Šturm, OKBD, Krajská nemocnice Pardubice
H. Kolouchová, Z. Hourová, Diagnostika, s.r.o., Ústí n. Labem
RNDr. P. Solichová, OLM Nemocnice Šternberk
Mgr. J. Drottnerová, OKM FN Brno
Mgr. J. Bednaříková, OKBD FN Olomouc

13.35 – 14.50 **Úvodní sdělení**
Předsedající: Prof.MUDr. R. Brdička DrSc., Ing. D. Novotný, Ph.D.

Prof.MUDr. R. Brdička, DrSc., ÚHKT Praha
Preanalytická fáze v procesu detekce nukleových kyselin – úvodní sdělení
(30 min.)

Doc.RNDr. I. Mazura,CSc.,PřF UK Praha, Katedra antropologie:
Starodávná DNA (20 min)

PharmDr. R. Haluza, Ph.D., Generi Biotech, Hradec Králové:
Uchování a katalogizace krevních skvrn (10 min)

MUDr. Z. Fiedler, Ph.D., ÚLBG LF UK Hradec Králové:
Vliv fixativ na kvalitu DNA (10 min)

14.50 – 15.00 **Přestávka**

15.00 – 15.40

Vybrané aplikace I.

Předsedající: MUDr. F. Musil, Ing. P. Riedlová,

Mgr. S. Tavandzis, Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín:

Záchyt mutací v genech BRCA 1 a BRCA 2 v souboru pacientů s karcinomem prsu (10 min)

Mgr. E. Průšová, Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín:

Molekulárně genetická diagnostika genu FBN1 u Marfanova syndromu (10 min)

Ing. P. Riedlová, Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín:

Mutační a expresní analýza genu DPD u pacientů léčených 5-fluorouracilem a jeho deriváty (10 min)

15.40 – 17.30

Komerční diagnostika a technika

Předsedající: Ing. F. Šturm, PharmDr. Jiří Skalický

Mgr. D. Žůrek, MUDr. I. Blanárik, Roche Diagnostics, s.r.o., Praha (15 min)

P. Dodal, MUDr. L. Lukeszová, Bio-Consult Laboratories, s.r.o., Praha (15 min)

RNDr. B. Bavlínka, Mgr. L. Cábová, Labmark a.s., Praha (10 min)

16.20 – 16.30

Přestávka

Mgr. S. Pěničková, RNDr. D. Elsnic, BAG Med. AG, Praha (10 min)

Mgr. J. Moos, CSc., Ing. R. Viček, IMMUNOTECH a.s., Praha (10 min)

MUDr. M. Šišák, G. Rašková, LABOSERV, s.r.o., Brno (10 min)

RNDr. R. Helm, CSc., AscoMed, s.r.o., Praha (10 min)

Mgr. K. Smutná, LACOMED, s.r.o., Praha (10 min)

Mgr. J. Čížek, Dynex Laboratories, s.r.o., Praha (10 min)

17.30 – 18.00

Diskuse

19.30 – 23.00

společenský večer v hotelu Zlatá štika

18. ledna 2007 čtvrtek

8.30 – 9.30

Vybrané aplikace II.

Předsedající : MUDr. Z. Medková, Ph.D., Mgr. O. Scheinost

MUDr. E. Žampachová, Virologické odd., Nemocnice České Budějovice:

Význam indikace vyšetření a volby materiálu při vyšetření extrahumánního genomu (15 min)

MUDr. J. Hyjánek, ÚLGaFM, FN Olomouc:

Cytomegalovirová infekce v graviditě (15 min)

Doc.MUDr. D. Šmajš, Ph.D., BÚ LF MU Brno:

**PCR diagnostika a molekulární typizace původce syfilis: aktuální problémy
PCR detekce (15 min)**

9.30 – 9.40 **Přestávka**

9.40 - 11.20 **Problematika detekce herpetických virů**

předsedající: RNDr. Jaroslav König, MUDr. Miroslav Förstl

RNDr. K. Roubalová, CSc., SZÚ Praha, Referenční laboratoř pro herpetické viry:

Problematika detekce herpetických virů (20 min)

MUDr. V. Štěpánová, ÚKM FN HK, PharmDr. L. Plíšková, Mgr. R. Bolehovská,
ÚKBD FN HK, MUDr. M.Förstl, ÚKM FN HK:

Zkušební série okružních vzorků pro průkaz CMV DNA (15 min)

10.30 - 10.40 **Přestávka**

MUDr. P. Žák, Ph.D., MUDr. A. Zavřelová, OKH FN Hradec Králové:

CMV – klinický význam kvantifikace (15 min)

Ing. N. Piskunova CSc., RNDr. M. Fialová, Mgr. P. Trubač, M. Jakubcová, LMBG,
Nemocnice České Budějovice:

Molekulární diagnostika herpetických virů (15 min)

Mgr. E. Soudková a kol., SEDIUM, s.r.o.- LMB KN Pardubice:

Vliv preanalytické fáze na kvalitu výsledků detekce herpetických virů (10 min)

11.20 – 11.30 **Přestávka**

11.30 – 12.00 **Varia**

moderují : Ing. M. Pejchalová, Ph.D., Mgr. M. Zemánek, Ph.D.

RNDr. T. Kuchta, CSc., Výskumný ústav potravinársky Bratislava:

**Optimalizácia 5'-nukleázovej polymerázovej reťazovej reakcie na identifikáciu
patogenných baktérií (15 min)**

Mgr. P. Králík, Ph.D., Mgr. I. Těšínská, Prof.MVDr. I. Pavlík, CSc. , Výzkumný ústav
veterinárního lékařství, Brno:

**Detekce a kvantifikace *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* v mléce
metodou Real Time PCR. (15 min)**

12.00 – 12.30 **Diskuse**

12.30 **Ukončení**

Hlavní sponzoři



Consult

Další sponzoři



ASCO MED s.r.o.



Prof.MUDr. Radim Brdička, DrSc.

ÚHKT Praha
Koordinační centrum genetických laboratoří
U Nemocnice 1
128 20 Praha 2

tel: +420-221977219

e-mail: Radim.Brdicka@uhkt.cz

Preanalytická fáze v procesu detekce nukleových kyselin – úvodní sdělení

Nejen při analýzách nukleových kyselin, ale pro všechny laboratorní diagnostické testy platí, že preanalytická fáze je klíčovým krokem na cestě mezi pacientem a výsledkem vyšetření. Obvyklé omezení preanalytické fáze na odběr primárního vzorku naráží často v případě nukleových kyselin na poměrně značnou vzdálenost mezi místem odběru a místem, kde dochází k analytické fázi. Proto se některé laboratoře zabývají pouze t.zv. vzorkováním, t.j. odběrem primárního vzorku, případně doplněným o přeměnu primárního vzorku ve vzorek sekundární v podobě nukleové kyseliny (v úvahu připadá spíše jen DNA).

Analytická fáze je pak zahajována buď izolací nukleových kyselin z primárního vzorku, nebo analýzou nukleových kyselin vzorku sekundárního. Laboratoře zabývající se vzorkováním by měly dodržovat pokyny obsažené v **Příručce pro odběr primárních vzorků**, kterou vypracovává laboratoř zabývající se analýzou nukleových kyselin. Vzorkovací laboratoře, které provádějí izolaci nukleových kyselin mají vypracován příslušný postup v rámci t.zv. standardního operačního protokolu (SOP).

Doc.RNDr. Ivan Mazura,CSc.

Katedra antropologie a genetiky člověka
PřF UK Praha
Viniční 7
128 00 Praha 2

tel.: +420-221951621

e-mail: i.mazura@seznam.cz

Starodávná DNA

Historie genetického testování „starodávné DNA“ se začala psát téměř současně s genetickými analýzami krevních vzorků moderního člověka, tj. v polovině 80.let minulého století.

První genetické analýzy byly prováděny na desítky let starých kosterních ostatcích a s postupem času byly analyzovány vzorky staré až několik tisíc let. S rozvojem molekulárně biologických technik se měnil také metodický přístup k analyzovaným lidským ostatkům.V průběhu dvacetileté historie „analýz starodávné DNA“ se také postupně rozšiřoval soubor lidských tkání, které mohly být testovány. Kromě kosterních ostatků jsou dnes analyzovány mumifikované tkáně, zuby či jejich fragmenty, v parafinu zalité fragmenty tkání, ale také např. formalinem dlouhodobě fixované muzeální vzorky. Současná analýza „starodávné DNA“ poskytuje odpovědi na otázky určení pohlaví testované tkáně, příbuzenského vztahu jednotlivých biologických materiálů či přítomnosti genetické informace patogenních mikroorganismů ve studovaných tkáních.

Velkým problémem testování „starodávné DNA“ je nejen její degradace různými vlivy prostředí, v němž se biologický materiál nalézá, ale také častá kontaminace vyšetřovaného biologického materiálu nejrůznějšími konzervačními činidly.

PharmDr. Radovan Haluza, Ph.D.

Generi Biotech s.r.o.
Machkova 587
500 11 Hradec Králové 11

tel.: +420-495056353

e-mail: radovan.haluza@generi-biotech.com

Uchování a katalogizace krevních skvrn

Abstrakta přednášky nedodána.

MUDr. Zdeněk Fiedler, Ph.D.

ÚLBG LF UK Hradec Králové
Šimkova 870
500 38 Hradec Králové

tel.: +420-495816492

e-mail.: fiedler@lfhk.cuni.cz

Vliv fixativ na kvalitu DNA

Zvláštním případem tzv. „ancienit“ DNA je nukleová kyselina obsažená v histologicky fixovaných tkáních. Fixativa narušují její celistvost a pravděpodobně i primární strukturu.

Možnosti postmortální či jakékoli jiné genotypizace DNA izolované z histologicky fixovaného materiálu jsou ztíženy a omezené. Přednáška shrnuje literární údaje vázané k této problematice a referuje o vlastních zkušenostech s s takto získanou nukleovou kyselinou.

Mgr. Spiros Tavandzis

P&R LAB, s.r.o.
Máchova 619/30
741 01 Nový Jičín

tel.: +420-556794154
e-mail.: spiros.tavandzis@pr-lab.cz

Záchyt mutací v genech BRCA 1 a BRCA 2 v souboru pacientů s karcinomem prsu

Tavandzis S., Průšová E., Riedlová P., Hořínová (Bryšová) V., Novotný J., Bóday A., Kopecká P., Radina M.

Mutační analýza vysoce penetrantních predispozičních genů BRCA1 a 2 je indikována u pacientek/ů s nádorem prsu u nichž je podezření na hereditární formu tohoto onemocnění. K analýze kompletní kódující sekvence obou genů využíváme screeningovou metodu denaturační vysoce účinné kapalinové chromatografie - DHPLC. Alelová heterogenita obou genů, jejich rozsáhlost, a neexistence funkčních testů, které by spolehlivě prokázali dopad všech typů mutací na funkci proteinu, znesnadňují hodnocení výsledků molekulárně genetické analýzy. Navíc velká intragenová přeskupení, která se v obou genech vyskytují nejsou detekovatelná metodami založenými na prosté PCR. Kromě detekce nukleotidových záměn, malých insercí a delecí je proto nutné sledovat také přítomnost velkých intragenových přestaveb. MLPA analýza, kterou využíváme pro detekci těchto změn v obou genech, nám umožnila odhalit rozsáhlé delece, které při DHPLC analýze nemohly být zachyceny.

V průběhu dvou let bylo metodou DHPLC v laboratoři molekulární biologie analyzováno 108 probandek/ů pocházejících z rizikových rodin. V tomto souboru bylo detekováno 22 patogenních mutací (20,4%). U souboru probandek/ů, u nichž byl výsledek DHPLC screeningu negativní, probíhá retrospektivní MLPA analýza obou genů.

Mgr. Eva Průšová

P&R LAB, s.r.o.
Máchova 619/30
741 01 Nový Jičín

tel.: +420-556794154
e-mail.: eva.prusova@pr-lab.cz

Molekulárně genetická diagnostika genu FBN1 u Marfanova syndromu

Průšová E¹, Bóday A¹, Zlámáliková E¹, Riedlová P¹, Kolaříková H², Fišer J²,
Janýšková H¹, Radina M³

¹*Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín, Laboratoř molekulární biologie,*
²*Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín, Laboratoř forenzní DNA diagnostiky,*
³*Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín, Laboratoř biochemie*

Marfanův syndrom (MFS) patří do skupiny systémových onemocnění zvaných fibrillinopatie. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění pojivových tkání s incidencí kolem 1/5-10 000. Až 25% případů však může být sporadických.

Klinicky se MFS vyznačuje velkou variabilitou. Mezi hlavní příznaky patří poruchy kardiovaskulárního systému, očního a kostního systému. Příčinou tohoto onemocnění jsou mutace v genu FBN1, který je lokalizován na chromozomu 15q15-q21.1. V lidském genomu patří FBN1 do skupiny velkých genů - je dlouhý 235 kb, má 65 exonů, které kódují 2871 aminokyselinových zbytků. Produktem je extracelulární protein fibrillin 1, který je součástí elastických i non-elastických mikrofibril pojivových tkání. Odtud pramení postižení více orgánových systémů.

V Laboratoři molekulární biologie Onkologického centra J. G. Mendla v Novém Jičíně jsme zahájili molekulárně genetickou diagnostiku genu FBN1 z genomické DNA. Po PCR všech exonů se provádí screeningová metoda SSCP. Vzorok, u kterých byly nalezeny odchylky při migraci v polyakrylamidovém gelu jsou následně sekvenovány. Umožňuje to poměrně rychlou a přesnou analýzu FBN1 genu. Úspěšnost analýzy ve velké míře ovlivňuje přesně stanovená klinická diagnóza dle přísných „ghentských“ kritérií.

Ing. Petra Riedlová

P&R LAB, s.r.o.
Máchova 619/30
741 01 Nový Jičín

tel.: +420-556794154

e-mail.: petra.riedlova@pr-lab.cz

Mutační a expresní analýza genu DPD u pacientů léčených 5-fluorouracilem a jeho deriváty

Riedlová P¹, Bóday A¹, Fišer J², Richterová R¹, Průšová E¹, Gucký T³, Kopecká P¹, Kučerová M³, Radina M³

¹*Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín, Laboratoř molekulární biologie,*
²*Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín, Laboratoř forenzní DNA diagnostiky,*
³*Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín, Laboratoř biochemie*

Dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD) je enzym, jehož aktivita je limitující při degradaci protinádorového léčiva 5-fluorouracilu (5-FU) na neaktivní metabolity. Přestože jsou 5-fluorouracil a jeho profarmaka již několik desítek let léčivy první volby při léčbě karcinomů gastrointestinálního traktu a dalších, existuje při podání riziko toxických a ojediněle až letálních reakcí. Příčinou může být porucha katabolismu pyrimidinů, nejčastěji deficiencie DPD, která vede ke kumulaci toxického léčiva, resp. jeho metabolitů v organismu.

Expresí genu DPD je tkáňově specifická a za normálních okolností se projevuje převážně v játrech. Defekty aktivity DPD jsou dány mutacemi nebo sníženou expresí genu DPD, která se může vyvinout v důsledku léčby fluoropyrimidiny.

V retrospektivní studii u informovaných pacientů s projevy toxicity po léčbě 5-FU je prováděna chromatografická analýza metabolitů DPD (uracilu a dihydrouracilu) v plazmě, resp. v moči a následně molekulárně genetická analýza exprese genu DPD na úrovni RNA, případně mutační analýza na úrovni DNA. V rámci tohoto sdělení prezentujeme používané metodiky a dosavadní výsledky práce. Cílem práce je vytvořit diagnostický postup, kterým by se mohlo předejít potenciálním toxickým reakcím u pacientů, u kterých je plánovaná léčba 5-FU.

MUDr. Eva Žampachová

Virologické odd.
Nemocnice České Budějovice, a.s.
B. Němcové 54
370 87 České Budějovice

tel.: +420-387873650

e-mail: zampacho@nemcb.cz

Význam indikace vyšetření a volby materiálu při vyšetření extrahumánního genomu

Mikrobiologické vyšetření je složitější o to, že popisuje interakci mezi mikro a makroorganismem. V preanalytické fázi je důležité nejen správné provedení odběru a uchování vzorku, ale hlavně odběr ze správného místa ve správnou dobu – tedy indikační fáze vyšetření. Na příkladech z praxe i z literatury je demonstrováno, jaký význam pro validní výsledek vyšetření má nejen technologie odběru a preanalytické fáze týkající se konkrétního již odebraného vzorku, ale hlavně význam odběru vzhledem k průběhu onemocnění a vazba na ostatní vyšetření. Množství prokazované nukleové kyseliny extrahumánního genomu je proměnlivé. Proto musí indikující osoba dobře znát patogenezí infekčních onemocnění. Je nutné jednotlivá mikrobiologická vyšetření provázat a společně interpretovat. Těžištěm práce klinického lékaře je syntéza klinických a laboratorních nálezů ke stanovení diagnózy, dílčí interpretaci laboratorních nálezů očekává od laboratoře. Proto je indikace a interpretace nedílnou součástí laboratorního vyšetření.

MUDr. Jiří Hyjánek

Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny
FN Olomouc
I.P.Pavlova 6
775 20 Olomouc

tel.: +420-588442866
e-mail: Hyjanek@fnol.cz

Cytomegalovirová infekce v graviditě

J.Hyjánek, D. Horák, D.Novotný

Cytomegalovirus (CMV) způsobuje obvykle jako ostatní herpetické viry latentní infekce. Asi 60-65% žen má v období fertálního věku protilátky proti CMV. K sérokonverzi dochází nejčastěji mezi 15 až 35 lety věku. V sociálně slabších skupinách dosahuje séropozitivita v tomto období 85%. Primární CMV infekci prodělává 0,7 – 4% gravidních žen, rekurentní onemocnění se vyskytuje u 13,5% gravidních. Vrozená CMV infekce postihuje ročně 1-2% novorozenců. Primární infekce zvyšuje riziko transplacentárního přenosu na plod ve 30 – 40%, naproti tomu při reinfekci jen v 1%. Kongenitální CMV infekce vyvolává asi u 10% nakažených plodů syndrom, který může zahrnovat následující příznaky: chorioretinitida, hluchota, mikrocefalie, vady CNS, intrakraniální kalcifikace, záchvaty křečí, hypotrofie, mentální a motorická retardace, ikterus, hemolytická anemie a trombocytopenická purpura. Prenatálně lze diagnózu nejspolehlivěji potvrdit průkazem viru v amniální tekutině pomocí PCR diagnostiky se senzitivitou 80-100% s komparací s DNA diagnostikou viru z krve matky. U infikovaných plodů se může vyskytovat i patologický nález při ultrasonografickém vyšetření zahrnující mozkovou ventrikulomegalii, kalcifikace CNS, hepatomegalii, ascites až hydrops, růstovou retardaci, abnormální kalcifikaci v intestinu a játrech. Kazuistika dokladuje diagnostiku CMV infekce u plodu pomocí vyšetření UZ, IMR plodu a molekulárně genetického vyšetření PCR CMV.

Doc.MUDr. David Šmajš, Ph.D.

Biologický ústav LF MU Brno
Kamenice 5
budova A6
625 00 Brno

tel.: +420-549497496

e-mail: dsmajs@med.muni.cz

PCR diagnostika a molekulární typizace původce syfilis: aktuální problémy PCR detekce

Komparativní genomika patogenních spirochet odhalila chromosomální oblasti původce syfilis, *Treponema pallidum* ssp. *pallidum*, které jsou variabilní v několika vyšetřených kmenech tohoto poddruhu a které jsou ohraničeny konzervovanými sekvencemi. Zavedli jsme metodu detekce chromosomální DNA *T. p. pallidum* dvoukrokovou (nested) PCR reakcí, která amplifikuje část genu TP0319 (*tmpC*), kódujícího hypotetický membránový lipoprotein. PCR amplifikace a sekvenování DNA genů TP0136 a TP0548 z pozitivních vzorků prokázalo výskyt jak kmenů sekvenčně identických s kmenem *T. p. pallidum* SS14, tak také unikátních syfilitických kmenů, doposud u *T. p. pallidum* nepopsaných. Aktuální problémy PCR detekce *T. p. pallidum* v klinickém materiálu zahrnují zejména výběr a odběr klinických vzorků, jejich transport a zpracování. Pokroky v molekulární typizaci *T. p. pallidum* v klinickém materiálu přispějí k rozvoji epidemiologie syfilis a přinesou možnosti rozlišení mezi reinfekcí a reaktivací syfilitického procesu.

RNDr. Kateřina Roubalová, CSc.

Národní referenční laboratoř pro herpetické viry
SZÚ Praha
Šrobárova 48
100 42 Praha 10

tel: +420-267082247

e-mail: herpesvir@szu.cz

Problematika detekce herpetických virů

Specifické biologické vlastnosti herpetických virů, zejména schopnost vyvolat latentní infekci organismu spojenou s celoživotním nosičstvím viru, reaktivace infekce v podmínkách oslabení imunitního systému a vysoký stupeň promořenosti populace komplikují laboratorní diagnostiku onemocnění, které s těmito infekcemi souvisí. Zavedení amplifikačních metod průkazu virových nukleových kyselin do rutinní diagnostiky přineslo nejen zásadní změnu v možnostech přímého průkazu virů, ale i nový pohled na jejich životní cyklus, mechanismy regulace latence a nové poznatky o patogenezi infekce. Pomocí detekce virové DNA bylo prokázáno, že latentní fáze infekce je provázána persistentní replikací viru, udržovanou na nízké úrovni mechanismy imunitního systému a spojenou s asymptomatickým vylučováním virů v oblasti oropharyngu, či genitourinárního traktu. Ukázalo se, že hladina replikace viru je hlavním faktorem, ovlivňujícím patogenní projevy infekce. Bylo zjištěno, že jak primární, tak rekurentní infekce mohou být spojeny s šířením viru krevní cestou a s ním související přechodnou virémií, kterou lze využít pro časnou diagnostiku. Technika PCR umožnila detekci herpetických virů v daleko širší škále klinických vzorků, prenatální diagnostiku kongenitálních infekcí a monitorování úspěšnosti antivirové terapie. Nové poznatky o biologii a patogenezi herpetických infekcí je nutno zohlednit při výběru, či konstrukci vhodných amplifikačních metod i při správné interpretaci jejich výsledků.

MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D.

ÚKM FN HK
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

tel: +420-495833259

e-mail: stepanova@fnhk.cz

Zkušební série okružních vzorků pro průkaz CMV DNA

Štěpánová V., Plíšková L., Bolehovská R., Förstl M.

Pro sestavování kontrolního panelu 8 vzorků byl použit kmen CMV AD 169 a pro negativní vzorky aqua pro injectione.

Kontrolní panel byl v rámci nultého ročníku EHK rozeslán 8 laboratořím, od kterých jsme obdrželi 9 výsledkových listů (jedna laboratoř zaslala 2 výsledkové listy pro jejich 2 různé metody). Kvantitativní výsledky byly zaslány v 7 případech.

Nejčastěji používaným způsobem je extrakce pomocí kolonek firmy QIAGEN (7x - QIAamp DNA Mini Kit nebo QIAamp DNA Blood Mini Kit). Ve dvou laboratořích byla použita extrakce pomocí magnetických partikulí.

Nejčastějším způsobem amplifikace je real-time PCR (6x komerční kit - QIAGEN RealArt CMV PCR Kit nebo LightUp ReSSQ CMV assay, 2x in-house metoda).

V jednom případě byla použita nested PCR s detekcí pomocí gelové elektroforézy.

Všechny použité komerční kity měly značku CE.

Kvalitativní a kvantitativní výsledky budou komentovány v přednášce.

MUDr. Pavel Žák, Ph.D.

II. interní klinika, FN a LF Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

tel: +420-495832686

e-mail: zakpavelHK@seznam.cz

CMV – klinický význam kvantifikace

P. Žák, A. Zavřelová, L. Plíšková², K. Bolehovská

II. interní klinika – OKH a ² ÚKBD, FN a LF v Hradci Králové, Univerzita Karlova Praha

CMV je jednou z hlavních příčin úmrtí po alogenní transplantaci krvetvorných buněk (aloTKB). Vysoce rizikovou skupinou jsou pacienti s počtem CD4+ buněk < 50/ mm³, dále po imunosupresivní terapii – fludarabinem / anti CD52 / ATG a s reakcí štěpu proti hostiteli s dlouhodobou kortikoidní terapií. Základním přístupem jak snížit frekvenci CMV infekce jsou profylaktická opatření a preemptivní terapie. K průkazu virémie v leukocytech užíváme standardní PCR, kvantitativní stanovení je provedeno technikou real time PCR s detekční mezí 70–100 kopií/ml. Aktivita CMV je monitorována u všech recipientů 1x týdně do dne 100 po aloTKB. V dalším průběhu je sledování CMV individuální dle stupně rizika. Do 100. dne po aloTKB je průkaz CMV virémie (PCR CMV > 100 kopií/ml) indikací k zahájení preemptivní terapie. Po dni 100 od aloTKB je zahájena preemptivní terapie při průkazu velké virové nálože (1000 kopií/ml) nebo pokud dojde k narůstání replikace CMV v kontrolním odběru po 48 hodinách. (práce podporována výzkumným záměrem FN MZO 00179906)

Ing. Natalja Piskunova, CSc.

Laboratoř molekulární biologie a genetiky
Nemocnice České Budějovice, a.s.
B. Němcové 54
370 87 České Budějovice

tel: +420-387873031

e-mail: piskunov@nemcb.cz

Molekulární diagnostika herpetických virů

Abstrakta přednášky nedodána.

Mgr. Eva Soudková

Laboratoř molekulární biologie
OKBD - SEDIUM, s.r.o.
Krajská nemocnice Pardubice
Kyjevská 303
530 03 Pardubice

tel: 466650084

e-mail: soudkova@nem.pce.cz

Vliv preanalytické fáze na kvalitu výsledků detekce herpetických virů

Soudková, E.¹⁾, Šimon, P.²⁾, Šafářová, P.¹⁾, Štumor, F.¹⁾

¹⁾ Pracoviště molekulární biologie, OKBD – SEDIUM, Krajská nemocnice Pardubice

²⁾ Univerzita Pardubice

V naší laboratoři jsme z důvodů zajištění správné pre-amplifikační fáze a důvodů provozních sledovali tři faktory uplatňující se při zpracování materiálu, které by mohly mít vliv na výsledek stanovení herpetických virů metodou real-time PCR. Tento vliv jsme sledovali především u stanovení EBV, pro které nám byla z klinických pracovišť zasílána plná krev. Prvním faktorem byl vliv způsobu separace plné krve (příprava buffy coatu či izolace NK přímo z plné krve). Druhým byl vliv délky časové prodlevy mezi příjmem a izolací NK (provedení izolace v den odběru, druhý, třetí či čtvrtý den po odběru) a třetím faktorem byl vliv typu izolace (kolonky QiaAmp DNA mini kit vs. automatický izolátor MagNA Pure Compact). Vliv těchto faktorů na výsledek real-time PCR EBV byl sledován stanovením hodnoty crossing-pointu na přístroji LightCycler. Z našich výsledků vyplývá, že stanovení EBV metodou real-time PCR lze provádět jak z buffy coatu, tak z plné krve, a to i třetí či čtvrtý den po odběru vzorku bez významného úbytku DNA. Rovněž izolace pomocí kolonek se jeví z hlediska výtěžku DNA stanovovaného viru srovnatelná, avšak časově náročnější, než izolace pomocí automatického izolátoru.

RNDr. Tomáš Kuchta, CSc.

Výskumný ústav potravinársky Bratislava
Oddelenie mikrobiológie a molekulárnej biológie
Priemyselná 4
P.O.Box 25
824 75 Bratislava

tel: +421-250237167
e-mail: kuchta@vup.sk

Optimalizácia 5'-nukleázovej polymerázovej reťazovej reakcie na identifikáciu patogenných baktérií

Metóda 5'-nukleázovej polymerázovej reťazovej reakcie s priebežnou fluorometriou (real-time PCR so sondami typu TaqMan) je efektívny moderný postup na identifikáciu patogenných baktérií, vyznačujúci sa vysokou citlivosťou, selektivitou a rýchlosťou. Na zabezpečenie dostatočnej spoľahlivosti sa odporúča jeho používanie vo formáte duplex s internou amplifikačnou kontrolou (IAC), pričom na identifikáciu patogénnej baktérie sa použije sonda označená farbivom FAM a na identifikáciu IAC sonda označená farbivom VIC, JOE alebo Yakima Yellow. Experimentálne sme porovnali fluorescenčné parametre sond označených rôznymi farbivami a zhášané rôznymi zhášačmi. Zistili sme, že z dostupných kombinácií je najvhodnejšie prvú sondu označiť farbivom FAM a zhášať ju BHQ1, druhú sondu označiť farbivom JOE a zhášať ju BHQ1. Najrozšírenejšiu (a najlacnejšiu) kombináciu označenia/zhášania sond FAM/TAMRA x VIC/TAMRA nie je možné korektne fluorometricky stanoviť v real-time PCR cykléroch s optikou vybavenou štandardnými filtrami. Na základe zmerania 3D-fluorescenčného spektra uvedeného systému sme navrhli optimálne fluorometrické podmienky pre túto kombináciu a v modelovom experimente sme potvrdili zvýšenie citlivosti merania a zníženie interferencie medzi optickými kanálmi.

Mgr. Petr Králík, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70
621 00 Brno

tel.: +420-533331615
e-mail: kralik@vri.cz

Detekce a kvantifikace *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* v mléce metodou Real Time PCR

Petr Králík¹, Iva Těšínská¹, Ivo Pavlík¹

¹Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 00 Brno

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP), původce paratuberkulózy u skotu, byl identifikován v kravském mléce a to i po pasterizaci při 71 až 72°C. Jednalo se jak o živé bakterie, které bylo možno kultivačně oživit, tak i o mykobakteriální DNA, která byla detekována pomocí PCR. Vzhledem k faktu, že MAP je možným původcem Crohnovy choroby u lidí, může být přítomnost MAP v mléce a v mléčných výrobcích významným rizikovým faktorem pro spotřebitele, zejména pro děti.

System pro detekci a kvantifikaci MAP je založen na detekci 2 nezávislých specifických lokusů v genomu MAP. Jedná se o inzerční sekvenci IS900, která se v genomu MAP vyskytuje v 15 až 20 kopiích a fragment F57 přítomný v jedné kopii. Pro odlišení falešně negativních vzorků byl do každého systému navrhnut interní standard na bázi kompetitivní PCR. Jako kvantifikační standardy byly použity plazmidy s naklonovanými PCR produkty lokusů F57 a IS900.

Současně byla vyvinuta metodika na izolaci vysoce čisté DNA z 50 ml mléka za použití komerčně dostupného kitu s několika modifikacemi. Kvalita a výtěžek izolované DNA byly ověřeny na uměle kontaminovaných vzorcích mléka. Následně byla metodika izolace DNA a Real Time PCR kvantifikace použita na vyšetření vzorků mléka z chovů se známým výskytem paratuberkulózy. Dosažený detekční limit je pro F57 Real Time PCR jsou 3 MAP/1 ml mléka. IS900 Real Time PCR je možno detekovat 1 MAP/5 ml mléka.

Práce byla vypracována s podporou grantu Ministerstva zemědělství České republiky MZE0002716201 a č. FOOD-CT-2005-007081 PathogenCombat (Brussels, EC).