

SBORNÍK SDĚLENÍ

odborné konference

**RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI**

RANK 2010

27. - 28. leden 2010, hotel Zlatá Štika, Pardubice

www.rank.cz

Organizační výbor konference:

Ing. František Štumor, Ph.D.
Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.
PharmDr. Jiří Skalický, Ph.D.
Ing. Barbara Štumrová
Mgr. Eva Soudková
MUDr. Miroslav Förstl
Alena Novotná
Blanka Páclová

Odborný garant konference:

Prof.MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

Sborník vydal:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 70
621 32 Brno

ISBN xxxxxxxxxx

Hlavní sponzoři



Další sponzoři



Oddělení klinické biochemie a diagnostiky,
Pardubická krajská nemocnice a.s., Kyjevská 44, 532 03 Pardubice

ODBORNÁ KONFERENCE

RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI 2010

RANK 2010

**27. a 28. leden 2010
v prostorách hotelu Zlatá Štika, Pardubice**

**je pořádána pod záštitou Ing. Josefa Šimurdy,
ředitele Pardubické krajské nemocnice, a.s.,**

odborný garant: Prof.MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA, ÚKBLD VFN Praha

hlavními sponzory konference jsou společnosti

ROCHE s.r.o.

Gene Proof a.s.

dalšími sponzory jsou společnosti :

LAB MARK a.s.

BAG Health Care GmbH

IMMUNOTECH a.s.

LABOSERV s.r.o.

Medisco Praha s.r.o.

DYNEX LABORATORIES s. r.o.

PROGRAM

27. ledna 2010 **středa**

10.00 – 12.30 **Registrace**

13.00 – 13.15 **Zahájení**

13.15 – 14.00 **Úvodní sdělení**

Prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc., Univerzita Palackého & Ústav experimentální botaniky AVČR, Laboratoř růstových regulátorů, Olomouc
Deriváty adeninu pro léčení nádorových onemocnění

14.00 – 16.00 **Analýza humánního genomu**

Mgr. Vlasta Čejnová a kol., Oddělení lékařské genetiky, Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z., Ústí nad Labem
Rychlá detekce nejčastějších chromozomálních aneuploidií pomocí QF-PCR: Kazuistiky z prenatální diagnostiky

RNDr. Martina Putzová, Ph.D. a kol., GENNET, s.r.o., Praha
Preimplantační genetická diagnostika monogenních chorob metodou PGH – naše výsledky za rok 2009

Mgr. Iva Sakmaryová, VIDIA-Diagnostika, Praha
Genetická vyšetření u nedoslýchavých dětí

14.50 – 15.10 **Přestávka**

Mgr. Jana Sabová a kol., DNA laboratoř, Klinika dětské neurologie, FN Motol, Praha
Vybrané vyšetřovací možnosti v molekulárno-genetické diagnostice dědičných neuropatií Charcot–Marie–Tooth na DNA úrovni

Mgr. Hana Slavíková, P&R LAB a.s., Laboratoř molekulární biologie, Nový Jičín
Zajímavé případy Marfanova syndromu z pohledu molekulární biologie

MUDr. František Musil a kol., BioLab s.r.o., Klatovy
Vzácná kombinace polymorfismů CYP2C9 a VKORC1 a její vliv na terapii warfarinem – kazuistika

16.00 – 16.15 **Přestávka**

16.15 – 17.15 **Diagnostika chřipky**

RNDr. Helena Jiřincová, SZÚ, NRL pro chřipku, Praha
Charakteristika viru chřipky A/H1N1 Pandemic 2009, aktuální situace ve světě a v ČR. Stručné zhodnocení metodických přístupů k diagnostice.

Mgr. Jakub Mrázek a kol., Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum klinických laboratoří, Odd. molekulární biologie, Ostrava
A(H1N1) 2009 – komplexní virologická diagnostika

Ing. František Štumor, Ph.D., SEDIUM s.r.o., Pardubická krajská nemocnice, a.s., Pardubice

Diagnostika chřipky pandemic A(H1N1) v Pardubické krajské nemocnici

17.15 – 17.30 **Přestávka**

17.30 – 18.30 **Firemní sdělení**

Roche s.r.o.
GeneProof a.s.
IMMUNOTECH a.s.
LAB MARK a.s.
BAG Health Care GmbH
Medisco Praha s.r.o.
DYNEX LABORATORIES s.r.o.
LABOSERV s.r.o.

19.30 – 23.00 **Společenský večer**

28. ledna 2010 **čtvrtek**

8.30 – 10.00 **Urgentní vyšetření v molekulární biologii**

Mgr. Jakub Mrázek a kol., Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum klinických laboratoří, Odd. molekulární biologie, Ostrava
Urgentní diagnostika bakteriálních meningitid metodou PCR – 5ti leté zkušenosti

MUDr. Lenka Petroušová a kol., Klinika infekčního lékařství, FN Ostrava
Využití PCR diagnostiky neuroinfekcí v klinické praxi, kazuistiky

Ing. Dalibor Novotný, Ph.D. a kol., OKB FN, Olomouc
Laboratorní aspekty urgentního vyšetřování herpetických virů u hematoonkologických pacientů

MUDr. Zuzana Rusiňáková a kol., Hemato-onkologická klinika, FN Olomouc
Herpetické infekcie u hematoonkologických pacientov – klinický pohľad

10.00 – 10.15 **Přestávka**

10.15 – 12.30 **Varia**

Ing. Anette Tizolová a kol., Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT, Oddělení klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Na Bulovce, Praha

Vývoj rychlé metody detekce *Bordetella pertussis* a *B. parapertussis* s využitím v klinické mikrobiologii

RNDr. Jan Křístek, CSc. a kol., Karlovarské imunologické centrum, s.r.o., Karlovy Vary

Detekce *Chlamydia trachomatis* ve výtěrech ze spojivkového vaku pomocí PCR

Mgr. Petra Pospíšilová a kol., Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Brno

Molekulární detekce syfilis: PCR diagnostika, typizace a detekce makrolidové rezistence u *Treponema pallidum*

11.15 – 11.30 Přestávka

Mgr. Jiří Štika, Ph.D., BIO-PLUS, spol. s r. o., Brno

Zavedení automatické izolace RNA pomocí zařízení Magna Pure Compact pro stanovení virové nálože HCV přístrojem COBAS TaqMan

Ing. Barbara Brežná, Ph.D. a kol., Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, SR

Diverzita kvasiniek a plesní vo vzorkách slovenského hrozna a muštu

RNDr. Tomáš Kuchta, DrSc. a kol., Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, SR

Využitie pšenice ako interného štandardu pri analýze pekárskych výrobkov metódou real-time PCR

12.30 – 13.00 Diskuse, závěr

Prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc.

Laboratoř růstových regulátorů
Ústav experimentální botaniky AVČR
Šlechtitelů 11
783 71 Olomouc

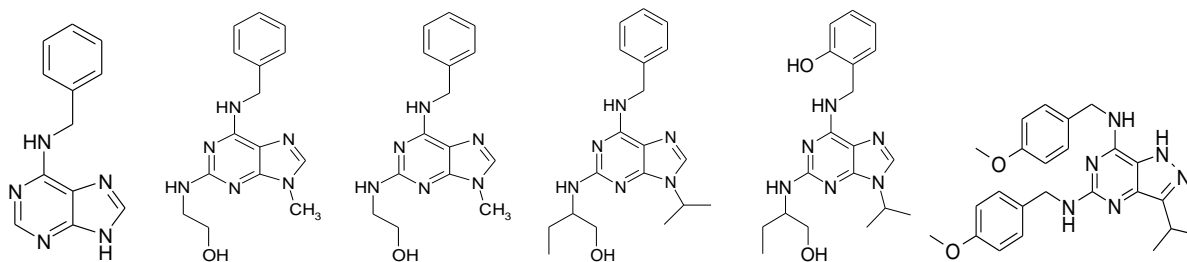
tel.: +420 585 634 850
e-mail: strnad@prfholnt.upol.cz

Deriváty adeninu pro léčení nádorových onemocnění

Strnad M.

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého & Ústav experimentální botaniky AVČR, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

Cytokininy jsou deriváty adeninu, jedné z bazí v naší DNA, které jsou substituované v poloze N⁶ izoprenoidním nebo aromatickým postranním řetězcem. Náš výzkum soustředující se na poznání molekulárních mechanismů účinku cytokininů v regulaci buněčného dělení prokázal, že přirozené rostlinné hormony cytokinininy jsou obecně nespécifickými inhibitory živočišných cyklin-dependentních kinas, klíčových enzymů každé eukaryotické buňky, ve které regulují aktivitu řady proteinů buněčného cyklu. Za velmi závažné lze považovat skutečnost, že v řadě lidských nádorů jsou cykliny a cyklin-dependentní kinasy abnormálně regulovány. Pro první specifický inhibitor CDK1/2 odvozený od N⁶-benzyladeninu (BA) byl navržen název olomoucín (OC). OC zadržuje buňky na hranicích G1/S a G2/M, což je v souladu s hypotézou o převládajícím vlivu OC na CDK1 a CDK2. Inhibiční aktivita OC byla dále zvýšena modifikacemi na C2, N6 a N9 adeninu, tzn., pozicích, které kontrolují vazbu k CDK1/2. Tento přístup vedl následně k vývoji nového, vysoce účinného inhibitoru CDK roskovitinu (ROSC, 6-(benzylamino)-2(R)/1-hydroxymethyl)propyl/amino-9-isopropylpurin), který vykazuje zvýšenou inhibiční aktivitu pro CDK1, vyšší selektivitu pro určité CDK, zvýšenou antimitotickou aktivitu v G1/S a G2/M přechodu buněčného cyklu a mnohem silnější protinádorové účinky. Objev olomoucínu stál na počátku vývoje nové generace protinádorových látek založených na specifické inhibici proteinkinasy homologní s CDK1/2 (obr.1). Následný vývoj vedl k vývoji dalších, mnohem účinnějších a specifičtějších inhibitorů CDK 1/2, jakými jsou např. roskovitin, bohemín a purvalanol A. Roskovitin končí 2B. fázi klinického zkoušení a testuje se v několika evropských zemích a v USA v multicentrické studii. Seliciclib[®] byl zkoušen na nádorech prsu a plicních nádorech v kombinaci se standardní chemoterapií. V průběhu zkoušení byly prováděny následující experimenty: (1) testování použití Seliciclibu v kombinaci se dvěma cytostatiky (gemcitabinem a *cis*-platinou) na malobuněčný karcinom plic; (2) testy použití Seliciclibu u rozvinutých nádorů prsu v kombinaci se dvěma dalšími léčivými (kapecitabinem a orálně podávaným „prodrug“ 5-fluorouracilem). Vedle inhibice CDK1/2 jsme se soustředili i na vývoj inhibitorů CDK7/9, které reprezentuje olomoucín II a dále na vývoj protinádorových chemoterapeutik kombinujících inhibici CDK s antimikrotubulární aktivitou – E.2.G.G. (obr.1). Tyto látky mají mnohem zajímavější protinádorový potenciál.



Obr. 1. Chemické struktury 6-benzylaminopurinu (BAP), olomocinu, boheminu, roskovitinu, olomocinu II a E.2.G.G. (z leva do prava).

Mgr. Vlasta Čejnová

Oddělení lékařské genetiky
Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.
Sociální péče 3316/12A
401 13 Ústí nad Labem

tel.: +420 477 112 471
e-mail: vlasta.cejnova@mnul.cz

Rychlá detekce nejčastějších chromozomálních aneuploidií pomocí QF-PCR: Kazuistiky z prenatální diagnostiky

Čejnová V., Wilimská M., Harmaš V., Stará M., Soukupová M., Laštůvková J.
Oddělení lékařské genetiky, Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.

Prevence chromozomálně podmíněných VVV je nejčastější indikací prenatální diagnostiky. Trizomie chromozomů 21, 18, 13 a aneuploidie chromozomů X a Y jsou zodpovědné za 95% chromozomálně podmíněných VVV. V současné době jejich prenatálně genetická diagnostika a prevence je indikována věkem matky, biochemickým screeningem sér těhotných v 16. – 18. týdnu gravidity a ultrazvukovým vyšetřením.

Kvantitativní fluorescenční PCR (*quantitative fluorescent PCR*, QF-PCR) nabízí rychlou prenatální detekci nejčastějších chromozomálních aberací bez kultivace fetálních buněk. Umožňuje odhalit aberace počtu chromozomů do druhého dne (v ideálním případě do 6 – 12 hodin) po odběru plodové vody či choriových klků z mikrokvant fetálních buněk bez jejich předchozí kultivace a podstatně tím zkrátit období nejistoty a stresu u vyšetřovaných gravidních žen.

Metoda QF-PCR je založena na principu kvantitativní PCR a na typizaci chromozomů specifickými trimerickými a tetramerickými nukleotidy. Tyto sekvence DNA jsou značeny fluorescenčně a jsou prezentovány polymorfismy sekvencí mikrosatelitní DNA (STR markery – *short tandem repeats*). STR markery jsou rovnoměrně rozprostřeny po všech chromozomech, jejich kombinace je unikátní pro každého jedince a dědí se z rodičů na potomky.

Pro amplifikaci se používají fluorescenčně značené primery pro marker specifický pro konkrétní chromozom, takže počet kopií každého markeru je úměrný signálu. Vzniklý PCR produkt je separován a analyzován na automatickém genetickém analyzátoru a každý fluorescenční produkt se zobrazí jako pík s určitou plochou, která je úměrná množství DNA.

Autoři prezentují tři případy využití metody QF-PCR v prenatální diagnostice.

RNDr. Martina Putzová, Ph.D.

GENNET, s.r.o.
Kostelní 9,
107 00 Praha 7

tel.: +420 604 473 856
e-mail: martina.putzova@gennet.cz

Preimplantační genetická diagnostika monogenních chorob metodou PGH - naše výsledky za rok 2009

Putzová M., Pecnová L., Krutilková V., Míka J., Křen R., Stejskal D.
GENNET, s.r.o.

Preimplantační genetická diagnostika (PGD) představuje pro mnoho párů přijatelnou možnost mít zdravé dítě a vyhnout se riziku případného ukončení těhotenství z genetických důvodů či narození postiženého potomka. Metodika úzce navazuje na techniky *in vitro* fertilizace (IVF) a je založena na analýze a vyloučení genetických abnormalit u embryí v časném stádiu jejich vývoje ještě před transferem zpátky do dělohy a následnou implantací. PGD monogenně podmíněných chorob vychází většinou z metod kombinujících přímý průkaz etiologické mutace s nepřímou vazebnou analýzou sousedících polymorfních sekvencí DNA v oblasti postiženého genu. Poslední jmenovaný postup je principem tzv. preimplantační genetické haplotypizace (PGH). Metodiku je možné použít k diagnostice širokého spektra monogenních onemocnění.

V našem centru byla PGH zavedena do klinické praxe v červenci v roce 2007, kdy byla úspěšně provedena preimplantační diagnostika u embryí páru s rizikem postižení potomků cystickou fibrózou. S rostoucí poptávkou ze strany pacientů se seznam monogenních onemocnění, které lze diagnostikovat pomocí PGH v našem centru, neustále rozšiřuje. V současné době nabízíme diagnostiku více než dvaceti onemocnění a na dalších pracujeme v pořadí, v jakém k nám přicházejí požadavky od pacientů. V loňském roce jsme navázali úspěšnou spolupráci s dalšími IVF centry v České republice. V letošním roce se oproti loňsku zdvojnásobil počet cyklů s plánovaným molekulárně-diagnostickým PGD a úspěšnost klinického těhotenství dosáhla na ET téměř 73%.

Mgr. Iva Sakmaryová

VIDIA-Diagnostika, s.r.o.
Gen. Janouška 902
198 00 Praha 9

tel.: +420 281 012 027
e-mail: sakmaryova@vidia-diagnostika.cz

GENETICKÁ VYŠETŘENÍ U NEDOSLÝCHAVÝCH DĚTÍ

Sakmaryová I. ¹, Rašková D. ², Seeman P. ²

¹VIDIA-Diagnostika Praha, ²Gennet Praha

Hluchota je nejčastější smyslovou vadou u lidí postihující 5 – 8 % populace ve vyspělých zemích. Asi jedno dítě z 1 000 narozených trpí vrozenou či prelingvální ztrátou sluchu. Nejméně polovina z těchto dětí nedoslýchá či neslyší následkem genetické poruchy. Z dalších příčin vrozené ztráty sluchu lze jmenovat např. bakteriální a virové infekce během těhotenství (CMV), užívání ototoxických léčiv a podob.

Porucha genu GJB2 pro connexin 26 (Cx26) je nejčastější známou genetickou příčinou nesyndromové prelingvální ztráty sluchu a hluchoty. Ztráta sluchu v souvislosti s mutacemi GJB2 (Cx26) genu se dědí autosomálně recesivně. Optimálním postupem po prokázání nedoslýchavosti u dítěte a po vyloučení možných získaných příčin je následně genetické vyšetření pacienta a jeho rodičů klinickým genetikem, který může vyloučit případný genetický syndrom spojený s dalšími vadami a následně indikovat DNA vyšetření GJB2 genu, které je dnes dostupné již na několika pracovištích v ČR.

Naše výsledky u českých pacientů ukázaly, že u téměř 40 % pacientů s nesyndromovou nedoslýchavostí jsou prokazatelné obě kauzální mutace v GJB2. U cca 6 % pacientů je prokazatelná pouze jedna kauzální mutace v kódující sekvenci GJB2 genu, což neumožňuje v jednotlivých případech objasnit příčinu vrozené hluchoty. Každoročně lze tedy očekávat narození asi 20 dětí, které jsou neslyšící v důsledku mutací v GJB2 genu. Nejčastější nacházenou mutací u českých pacientů je mutace 35delG, která u nás představuje 82,8 % všech kauzálních mutací.

Molekulárně genetické vyšetření může nálezem kauzálních mutací v GJB2 genu u pacientů s podezřením na ztrátu sluchu velmi spolehlivě a velmi časně tuto ztrátu potvrdit a objasnit. V případě zájmu rodiny je pak při znalosti kauzálních mutací principiálně možné i prenatální vyšetření nebo nově i preimplantační vyšetření během dalšího těhotenství. Pacienti s molekulárně geneticky potvrzenou a objasněnou prelingvální hluchotou mohou být dříve a velmi časně adekvátně léčeni včetně časných kochleárních implantací s předpokladem lepší celkové prognózy. U pacientů s časnou nedoslýchavostí, u kterých nebyly prokázány mutace v GJB2 genu, kde trvá podezření na genetickou etiologii je dalším možným krokem v DNA diagnostice vyšetření SLC26A4 genu.

Mgr. Jana Sabová

DNA laboratoř
Klinika dětské neurologie
FN Motol
V Úvalu 84
150 06 Praha 5 – Motol

tel.: +420 224 436 789
e-mail: jana.sabova@lfmotol.cuni.cz

Vybrané vyšetřovací možnosti v molekulárně - genetické diagnostice dědičných neuropatií Charcot – Marie – Tooth na DNA úrovni.

Sabová J. a kol.
DNA laboratoř, FN Motol, Praha

Dědičné periférní neuropatie (Charcot-Marie-Tooth, zkratka CMT) patří do skupiny genetických a fenotypově heterogenních onemocnění. Sú nejčastějším geneticky podmíněným onemocněním postihujícím periférní nervové svalstvo s celosvětovou prevalencí 1 : 2500.

Najčastějšou genetickou poruchou po stanovení klinické diagnózy choroby CMT sú duplikácie (resp. delécie) PMP22 génu nachádzajúcom sa v submikroskopickej oblasti veľkosti 1,4 Mb, a ktoré predstavujú až 70 % všetkých CMT prípadov. Ďalšími príčinami ochorenia sú mutácie ďalších génov zúčastňujúcich sa pri vývoji a funkcii neurónov a nervových obalov. Poruchy u týchto génov možno v súčasnej dobe diagnostikovať po stanovení klinickej diagnózy pomocou molekulárno-genetického vyšetrenia s možnosťou prenatálnej diagnostiky.

K detekcii počtu kópií génu PMP22 (CMT1A duplikácie, HNPP delécie), využívame súbor 16 mikrosatelitných markérov pomocou kvantitatívnej fluorescenčnej PCR s následnou fragmentačnou analýzou na automatickom sekvenátore ABI Prism 310. Súbežne s touto metódou využívame k detekcii počtu kópií aj metódu kvantitatívnej real-time PCR pomocou špecifických TaqMan sond a najnovšie zavádzame rutinne ako verifikačnú metódu - MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification). Pokiaľ sa nepotvrdí táto najčastejšia porucha, nasleduje vyšetrenie ostatných typov CMT – zamerané na detekciu mutácií u ďalších génov, ktorých porucha vedie k vzniku dedičných neuropatií a to pomocou sekvenačnej analýzy (PMP22, MPZ, GDAP1, Connexin 32, MFN2, HSP22, HSP27, NDRG1, SPTLC1, RAB7, SIMPLE). V poslednom období došlo k nárastu počtu prenatálnych vyšetrení u jednotlivých typov ochorení CMT, čo pred niekoľkými rokmi nebolo natoľko aktuálne ako dnes. Vďaka pokrokom v molekulárnej biológii sa budeme aj naďalej snažiť zdokonaľiť rutinnú molekulárno-genetickú diagnostiku zavedením ďalších metód umožňujúcich detekciu genetických porúch u dedičných neuropatií Charcot-Marie-Tooth.

Kľúčové slová: dedičné neuropatie Charcot-Marie-Tooth, molekulárno-genetická diagnostika, detekcia mutácií

Mgr. Hana Slavíková

P&R LAB a.s.
Laboratoř molekulární biologie
Divadelní 2174
741 01 Nový Jičín

tel.: +420 556 794 230
e-mail: hana.slavikova@onkologickecentrum.cz

Zajímavé případy Marfanova syndromu z pohledu molekulární biologie

Slavíková H., Průšová E., Puchmajerová A., Baxová A., Šubrt I.
P&R LAB a.s., Laboratoř molekulární biologie, Nový Jičín

Marfanův syndrom je autozomálně dominantní onemocnění pojivových tkání s prevalencí 1:10 000. Tento syndrom je řazen do skupiny onemocnění tzv. fibrilinosyndromu (spolu s MASS syndromem, Ectopia Lentis). Příčinou Marfanova syndromu jsou mutace v genu FBN1 (93%), TGFBR2 a FBN2. Gen FBN1 kóduje protein fibrilin, jež je součástí mikrofibril pojivových tkání. Projevy tohoto multisystémového onemocnění jsou tudíž vysoce variabilní. Nejzávažnějším je postižení kardiovaskulárního systému, přičemž nejčastější příčinou úmrtí pacientů je akutní disekce aorty. Vyskytuje se typické postižení okulárního systému a skeletálního systému označované jako marfanoidní habitus.

V naší laboratoři provádíme screening genů FBN1 a TGFBR2. K detekci velkých delecí či inzercí v genu FBN1 využíváme metodu MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification). Molekulární analýzu genů FBN1 a TGFBR2 provádíme metodou SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) s následnou identifikací nalezené konfirmační změny pomocí sekvenací.

Z laboratorní praxe zařazujeme tři zajímavé případy pacientů z hlediska molekulární diagnostiky. V prvním případě se jedná o vzácnou neonatální formu Marfanova syndromu. Druhý případ popisuje náhodné odhalení ojedinělého výskytu dvou typů mutací v genu FBN1 u jednoho pacienta a jeho rodiny. Ve třetí kazuistice se zabýváme problematikou alternativního splicingu.

MUDr. František Musil

BioLab s.r.o.
Nádražní 844
339 01 Klatovy 3

tel.: +420 376 322 081
e-mail: musil@biolab-kt.cz

Vzácná kombinace polymorfismů CYP2C9 a VKORC1 a její vliv na terapii warfarinem – kazuistika.

Musil F., Šollová I., Tučková A.,
BioLab s.r.o., Klatovy

Kazutistika popisuje 60-letého pacienta (155 kg, 193 cm), diabetika 2. typu s výraznou obezitou, s ischemickou chrobou srdeční s těžkou dysfunkcí levé komory, s dilatační kardiomyopatií a perzistentní fibrilací síní.

Pacient po zahájení antikoagulační terapií warfarinem dosahuje po obvyklých dávkách hodnot INR 8-9 s nutností aplikace vitamínu K. Praktickým lékařem bylo vysloveno podezření na sníženou úroveň metabolismu warfarinu na genetickém podkladě se zvýšením citlivosti vůči jeho účinkům a požádáno o provedení molekulárně biologického vyšetření DNA.

Metodou PCR s následnou reverzní hybridizací na přítomnost polymorfismu genu cytochromu P450 varianty CYP2C9 (430 C>T a 1075 A>C) a genu vitamínu K epoxidreduktázového komplexu podjednotky 1 VKORC1 (-1639 G>A) je zavedena v laboratoři BioLab Klatovy od konce roku 2008 (kit PGX-Thrombo StripAssay od firmy ViennaLab Diagnostics GmbH, distribuce v ČR zajišťována firmou PentaGen s.r.o.).

Výsledkem DNA analýzy bylo zjištění kombinace vzácně se vyskytující homozygotní mutace CYP2C9 3*/3*, která způsobuje výrazné zpomalení metabolismu aktivnější S frakce warfarinu. Dále byla prokázána homozygotní mutace VKORC1 A/A zvyšující senzitivitu vůči účinkům kumarinových preparátů.

Uvedené sdělení dokládá současný a především budoucí trend směrem k individualizované farmakoterapii na podkladě farmakogenetických údajů. Dalším možným případem je například souvislost polymorfismu genu pro UDP-glukuronosyltransferázu 1A1 UGT1A1*28 a zvýšených nežádoucích účinků (leukopenie, průjmy) při terapii kolorektálního karcinomu preparátem irinotecan.

RNDr. Helena Jiřincová

NRL pro chřipku
Státní zdravotní ústav
Šrobárova 48
100 42 Praha

tel.: +420 267 082 421
e-mail: h.jirincova@szu.cz

Charakteristika viru chřipky A/H1N1 Pandemic 2009 , aktuální situace ve světě a v ČR. Stručné zhodnocení metodických přístupů k diagnostice.

Jiřincová H., Havlíčková M.
SZÚ Praha

Pandemický virus chřipky má poměrně složitý původ, a nese v sobě segmenty pocházející z americké linie virů chřipky prasat, z euroasijské linie virů chřipky prasat, PB1 segment ze sezónního lidského kmene H3N2, a některými segmenty je blíže ke kmeni H1N1 z roku 1918, než další jeho další praprotomek, tedy epidemický lidský kmen A/ H1N1.

Dosud získané izoláty nesou jen ojediněle sekvence zodpovědné za rezistenci vůči antivirotikům zaměřeným proti virové neuraminidáze, a malá epidemická ohniska těchto kmenů byla doposud zaznamenána jen výjimečně. Naopak, všechny izoláty jsou přirozeně rezistentní vůči amantadinu/rimantadinu.

V naprosté většině případů nebyly u izolovaných kmenů zjištěny sekvence zodpovědné za zvýšenou patogenicitu, či virulenci.

Na základě dosavadních znalostí, však tento virus ani nenesení příliš mnoho znaků, které jsou určující pro snadný přenos v lidské populaci. Svými genetickými předpoklady se jeví jako virus ptačí, případně prasečí, což ovšem neznamená nic jiného, že je třeba přehodnotit dosavadní hypotézy.

Do 17.12. bylo v Praze v NRL pro chřipku vyšetřeno celkem 3042 osob, z nichž bylo 1 218 pacientů pozitivních, 411 bylo hospitalizovaných, z toho 42 na JIP či ARO.

Ve čtyřech případech bylo potvrzeno, že se jedná o chřipku A lidského původu (v jednom případě import z Mexika).

V ČR do konce září šlo v naprosté většině případů bylo onemocnění lehké, pouze v jednom případě bylo vážné s nutností hospitalizace, kdy byl pacient těžce dušný, trpěl vysokými horečkami a došlo k rozvoji intersticiální pneumonie. Od nástupu chladných dnů a zvýšení nemocnosti na ARI/ILI dochází ke zvýšení počtu úmrtí, nejčastěji na virovou pneumonii. Ve většině případů vážných onemocnění se jednalo o pacienty, kteří trpěli jiným chronickým onemocněním (nádorových, kardiovaskulárním, extrémní obezitou), rovněž byly zaznamenány případy komplikací v těhotenství.

165 pacientů bylo léčeno antiviroty, z nichž pouze 4 Relenzou.

Dále bude prezentováno:

- Stručné zhodnocení jednotlivých metodických přístupů k diagnostice (ELISA detekce antigenu, „near patient“ testy, real time PCR, zkušenosti s izolací viru), WHO metodická a bezpečnostní opatření,
- Důležité aspekty pro úspěšný průkaz viru, přehled výsledků serologického vyšetření části pacientů.
- Přehled potvrzených případů v souvislosti s epidemiologickou a klinickou anamnézou a věkem.
- Aktuální situace ve světě, nemocnost, záchyt důležitých mutací, počet závažných či fatálních onemocnění.

Mgr. Jakub Mrázek

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě
Centrum klinických laboratoří
Odd. molekulární biologie
Partyzánské nám. 7
702 00 Ostrava

tel.: +420 596 200 266
e-mail: jakub.mrazek@zuova.cz

A(H1N1) 2009 - komplexní virologická diagnostika

Mrázek J., Lazarová Z., Januška J., Kloudová A.
Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum klinických laboratoří

V dubnu roku 2009 byl v USA a Mexiku poprvé detekován nový chřipkový virus přenosný mezi lidmi vykazující genové segmenty podobné prasečím virům chřipky. Během několika málo týdnů se virus rozšířil do mnoha zemí na celém světě a vyvolal tak první chřipkovou pandemii 21. století.

30. dubna zveřejnilo WHO ve spolupráci s CDC protokol pro průkaz tohoto nového viru chřipky metodou real-time PCR. Využití této metody umožňuje poprvé v historii lidstva velmi podrobně (a s napětím) sledovat průběh pandemie chřipky v „reálném čase“.

V průběhu května 2009 naše laboratoř odzkoušela ve spolupráci s NRL pro chřipku zveřejněnou metodiku průkazu RNA pandemické chřipky A(H1N1)2009 a zahájila rutinní diagnostiku tohoto onemocnění pro Moravu. Společně s touto molekulárně biologickou diagnostikou je prováděna také klasická virologická diagnostika zahrnující kultivaci viru na buněčných kulturách MDCK, hemaglutinační test pro průkaz agens a průkaz protilátek komplement fixační reakcí. Naše pracoviště disponuje také elektronovou mikroskopií.

Od května 2009 do konce listopadu 2009 bylo v naší laboratoři vyšetřeno téměř 650 vzorků a zjištěno bezmála 200 případů infekce virem chřipky A(H1N1)2009. V 10 případech byl prokázán virus chřipky A s tím, že nebylo možno určit, zda se jedná o sezónní chřipku, či chřipku novou.

PCR diagnostika chřipkových onemocnění zaznamenává v posledních měsících nebývalý boom, zajisté také dílem medializace současně probíhající pandemie. Tato rychlá a spolehlivá diagnostika je výborným nástrojem pro sledování epidemiologické situace při šíření tohoto viru. Přínos této poměrně náročné a drahé diagnostiky pro účely léčby a péče o konkrétní pacienty bude jistě předmětem mnohých diskuzí a otázek, na něž budeme schopni jednoznačně odpovědět až zpětně.

Ing. František Štumor, Ph.D.

SEDIUM s.r.o.
OKBD PKN a.s.
Laboratoř molekulární biologie
Kyjevská 303
532 03 Pardubice

tel.: +420 466 650 084
e-mail: frantisek.stumor@sedium.cz

Diagnostika chřipky pandemic A(H1N1) v Pardubické krajské nemocnici

Štumor F., Soudková E., Fabiánová S., Šťastná I.,
SEDIUM s.r.o., Laboratoř molekulární biologie, Pardubice

Rutinní diagnostika chřipky pandemic A(H1N1) byla v Pardubické krajské nemocnici a.s. (PKN) zahájena 4. 11. 2009. K odběrům je nejvíce používána souprava Micro Test™ M4RT®, (REMEL, USA). Nejčastějšími vzorky jsou stěry z horních cest dýchacích. Izolace nukleových kyselin je prováděna na automatickém přístroji k izolaci Magna Pure Compact soupravami Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (kat.č. 03 730 964 001, ROCHE, USA). K izolaci je používán program TOTAL_NA_Plasma, objem vzorku 400 µl, eluční objem 100 µl. Amplifikace a detekce RT-PCR je prováděna s použitím souprav RNA Virus Master (kat.č. 05 619 416 001) a Influenza A/H1N1 Detection Set (kat.č. 05 977 207 001) na automatickém přístroji Light Cycler I (ROCHE, USA).

Komplexní detekce je založena na :

1. identifikaci viru chřipky A (M2)
2. identifikaci subtypu A(H1N1) (hemaglutinin HA1)
3. identifikaci vnitřní kontroly (lidská DNA) k ověření správnosti odběru, izolace NA, amplifikace a detekce.

Vybrané vzorky jsou zasílány ke confirmaci výsledků do NRL pro chřipku, SZÚ Praha. Prezentace bude doplněna o aktuální statistické údaje – počty vyšetřených vzorků, výsledky detekcí, počty a výsledky confirmací.

Mgr. Jakub Mrázek

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě
Centrum klinických laboratoří
Odd. molekulární biologie
Partyzánské nám. 7
702 00 Ostrava

tel.: +420 596 200 266
e-mail: jakub.mrazek@zuova.cz

Urgentní diagnostika bakteriálních meningitid metodou PCR - 5 leté zkušenosti

J.Mrázek¹, L.Fischerová¹, L.Petroušová²

¹Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum klinických laboratoří

²Fakultní nemocnice Ostrava, Klinika infekčního lékařství

Purulentní meningitidy patří k nejzávažnějším akutním onemocněním. Jejich průběh je velmi rychlý a pokud nejsou včas rozpoznány a není včas zahájena cílená léčba, mohou končit úmrtím pacienta nebo zanechat trvalé následky.

Nejčastějšími původci purulentních meningitid jsou *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* a *Haemophilus influenzae*. Přes etiologickou pestrost jsou jejich klinické, laboratorní i morfologické projevy velmi podobné. Proto má pro klinika zásadní význam co nejrychlejší určení etiologického agens, aby mohla být včas zahájena racionální cílená terapie.

Klasické mikrobiologické metody, jako je latexová aglutinace přímo u lůžka pacienta a mikroskopie, jsou sice velmi rychlé, mají však svá úskalí. Kultivace je poněkud zdoluhavá a často u pacientů u nichž byla zahájena terapie, selhává. Izolace etiologického agens má význam především pro stanovení citlivosti na antibakteriální látky a pro sledování dalších vlastností izolovaného kmene, eventuálně pro epidemiologické studie.

Naše laboratoř již od roku 2004 provádí diagnostiku purulentních meningitid (všech výše uvedených agens) pomocí metod PCR, které umožňují rychlý, specifický a velmi citlivý průkaz přítomnosti DNA daného původce přímo ve vzorku likvoru či krve. První metody byly zavedeny ve spolupráci s NRL pro meningokokové nákazy a byly postaveny na principu nested PCR s elektroforetickou detekcí produktu na agarózovém gelu. Vyšetření jednoho vzorku trvalo obvykle 7-9 hodin, výsledek byl prakticky dostupný teprve následující den po přijetí vzorku do laboratoře. Problematický byl průkaz *S.pneumoniae*, specifický produkt amplifikace bylo možno pozorovat také u některých kmenů viridujících streptokoků.

V následujících letech byla tato diagnostika postupně převedena do formátu real-time PCR využívající TaqMan (SmartCycler), resp. FRET (LightCycler) sondy. Použití real-time PCR výrazně zkrátilo čas potřebný k provedení testu. V současné době využíváme také automatické izolace DNA na přístroji QIAcube. Vyšetření jednoho vzorku je tak možno zkrátit na 2,5 hodiny. Většina vzorků je tak zpracována již v den,

kdy je vzorek doručen do laboratoře (a to včetně mimopracovních dní). Použitím real-time PCR byla také zvýšena specificita průkazu *S.pneumoniae*.

Od července 2004 bylo v naší laboratoři provedeno celkem 355 testů na přítomnost DNA *N.meningitidis* (37 pozitivních), 392 testů na přítomnost DNA *S.pneumoniae* (63 pozitivních), 352 testů na přítomnost *H.influenzae* (4 pozitivní) a 370 testů na přítomnost DNA *L.monocytogenes* (13 pozitivních).

PCR diagnostika v kombinaci s klasickými mikrobiologickými metodami nabízí rychlou a kvalitní diagnostiku purulentních meningitid a výrazně tak přispívá k minimalizaci následku těchto závažných stavů.

MUDr. Lenka Petroušová

Fakultní nemocnice Ostrava
Klinika infekčního lékařství
17. listopadu 1790
708 52 Ostrava

tel.: +420 597 374 255
e-mail: lenka.petrousova@gmail.com

Využití PCR diagnostiky neuroinfekcí v klinické praxi, kasuistiky

Petroušová L.¹, Mrázek J.², Kloudová A.²

¹ Klinika infekčního lékařství, FN Ostrava

² Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Neuroinfekce je vždy akutní život ohrožující onemocnění. Včasná diagnostika původce a včasné zahájení léčby má vliv na průběh onemocnění a prognózu pacienta.

V dalším sdělení prezentujeme kazuistiku 3měsíčního kojence s herpetickou meningoencefalitidou. Včasné potvrzení etiologie onemocnění pozitivní PCR HSV1 z likvoru a včasná léčba acyklovirem měla vliv na dobrý průběh onemocnění, přestože nezabránila vzniku herpetických ložisek v CNS, jejich rozsah však minimalizovala. Na magnetické rezonanci byl nález posthemoragických změn parietálně vpravo a menší pozánětlivé ložisko v thalamu vlevo.

U 2. pacienta se jednalo o včasně diagnostikovanou listeriovou meningitidu, pozitivní PCR *Listeria monocytogenes* z likvoru. Pacient byl včas zaléčen ampicilinem a i přes základní diagnózu chronické lymfatické leukémie odešel v celkově dobrém stavu domů. 3. pacientem byl 5letý chlapec s prokázanou enterovirovou meningitidou, potvrzení etiologie onemocnění zkrátilo dobu hospitalizace na 5 dnů a chlapec mohl být v celkově dobrém stavu propuštěn do ambulantní péče.

Ke stanovení původce neuroinfekce vždy využíváme několik laboratorních metod současně. V klinické praxi jakékoliv stanovení původce je pro lékaře důležité. Zásadní pro léčbu neuroinfekcí je stanovení herpetické a listeriové etiologie onemocnění. Terapie v první linii nepokrývá vždy tyto původce. Včasné stanovení těchto původců umožňuje právě PCR. Rozšíření léčby o kauzální terapii je pro pacienta život zachraňující.

Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.

Fakultní nemocnice
Oddělení klinické biochemie
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc

tel.: +420 585 854 230
e-mail: dalibor.novotny@fnol.cz

Laboratorní aspekty urgentního vyšetřování herpetických virů u hematoonkologických pacientů

Novotný D.¹, Bednaříková J.¹, Rusiňáková Z.², Raida L.², Bartková M.¹, Zrníková L.¹

¹Oddělení klinické biochemie a imunogenetiky, Fakultní nemocnice Olomouc

²Hematoonkologická klinika Lékařské fakulty UP Olomouc a Fakultní nemocnice Olomouc

Herpetické infekce mohou představovat závažnou komplikaci u těžce imunokompromitovaných pacientů, zejména pak infekce vyvolané cytomegalovirem a virem Epstein-Baarové. Jejich monitorování proto musí probíhat v časových intervalech zajišťujících včasnou a rychlou klinickou intervenci. Vyšetřováním nukleových kyselin (CMV DNA a EBV DNA) metodou PCR v reálném čase lze zajistit nejen požadavek včasného dodání výsledku, ale i vysokou citlivost a specifickou analytického postupu. V postanalytické fázi vyšetření se jistým problémem jeví interpretace „pozitivních“ nálezů v oblasti meze stanovitelnosti použité metody.

Přednáška popisuje portfolio vyšetření a metodologii používanou pro vyšetřování DNA herpetických virů na OKB FN Olomouc, podává přehled počtu vyšetření provedených v roce 2009 u pacientů Hematoonkologické kliniky FN Olomouc a diskutuje analýzy s obtížnou interpretací laboratorního nálezu.

V závěru je zmíněn osobní názor autora k nezbytné míře informací o použitém vyšetřovacím postupu sdílených laboratorními pracovníky na straně jedné a klinickými pracovníky na straně druhé.

MUDr. Zuzana Rusiňáková

Fakultní nemocnice Olomouc
Hemato-onkologická klinika
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc

tel.: +420 588 444 221
e-mail: zuzana.rusinakova@fnol.cz

Herpetické infekcie u hematoonkologických pacientov – klinický pohľad

Rusiňáková Z.¹, Raida L.¹, Novotný D.², Bednaříková J.², Bartková M.², Indrák K.¹

¹Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP Olomouc a Fakultní nemocnice Olomouc

²Oddělení klinické biochemie a imunogenetiky, Fakultní nemocnice Olomouc

Herpetické infekcie predstavujú jednu zo závažných komplikácií liečby hematologických ochorení. Dominantne postihujú pacientov po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek (najväčším rizikom sú seronegatívni príjemci seropozitívneho štěpu), ale ohrození sú aj pacienti s chronickou lymfocytovou leukémiou a liečení purínovými analógmi, alemtuzumabom, imunosupresívami a v menšej miere i kortikoidmi. Obecne sú rizikovní všetci s alterovanou bunkovou zložkou imunitného systému (nízke hodnoty CD 4+ lymfocytov). Infekcie vyvolané vírusmi HSV 1, 2, VZV a HHV-6 majú zväčša relatívne benígny priebeh. Najväčšie riziko pre pacientov predstavujú infekcie vyvolané cytomegalovírusom a EBV asociované lymfoproliferácie/ potransplantačné lymfoproliferácie, ktoré sú spojené s vysokou mortalitou.

Diagnostika týchto stavov je značne problematická. Klinický obraz môže byť veľmi variabilný . Význam serologických metód je u pacientov s poruchou tvorby protilátok po chemoterapeutickej liečbe značne obmedzený a k rekonštitúcií protilátkovej odpovede pacientov po transplantácii dochádza až po relatívne dlhej dobe, zatiaľ čo výskyt napr. CMV choroby je dominantne viazaný na prvých 6 mesiacov po transplantácii. Izolácia a priama kultivácia vírusu v tkanivových kultúrach je proces veľmi zdĺhavý tak ako aj histologické a imunohistochemické vyšetrenie postihnutých tkanív. Ďalšou možnosťou je stanovenie antigénu pp 65. Významne postavenie v posledných rokoch získala priama detekcia patogéna pomocou PCR metodiky z krvi, likvoru či bronchoalveolárnej tekutiny. Výhodou tejto metódy je jej senzitivita, relatívna jednoduchosť, a hlavne rýchla dostupnosť výsledku . Určitým problémom je hranica pozitivity vyšetrenia (hlavne v prípade EBV, kde sa štandardne preemtívna liečba zahájuje pri titry PCR EBV > 1000 GE/1 ml plazmy), keďže aj u zdravej populácie dochádza k občasnej virémii bez klinického korelátu. Preemtívna liečba (zahájenie terapie u pacientov, ktorí nemajú klinické prejavy infekcie, ale vírus je u nich detekovaný) sa dnes vzhľadom k vysokej mortalite ochorení štandardne zaužívala. Z antirotík sa preemtívne dominantne používa gancyklovir, valgancyklovir při cytopénii foskarnet. Preemtívna liečba EBV infekcie zahŕňa aplikáciu rituximabu. Týmto spôsobom sme schopní znížiť výskyt CMV choroby či EBV asociovej lymfoproliferácie.

Účelom tejto prednášky je prezentovať na príklade diagnostiky a liečby našich pacientov nutnosť úzkej spolupráce klinického pracoviska a laboratórneho centra a poukázať na úskalia klinickej interpretácia laboratórných výsledkov.

Ing. Anette Tizolová

Fakultní nemocnice Na Bulovce
Oddělení klinické mikrobiologie
Budínova 2
182 00 Praha 8

tel.: +420 266 082 523
e-mail: anette.tizolova@gmail.com

Vývoj rychlé metody detekce *Bordetella pertussis* a *B. parapertussis* s využitím v klinické mikrobiologii

Ing. Anette Tizolová^{1,2}, Ing. Ivana Melenová Ph.D.¹, MUDr. Blanka Horová, prof. Ing. Kateřina Demnerová CSc.¹

¹Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT, Praha,

²Oddělení klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Na Bulovce.

Gram negativní bakterie *Bordetella pertussis* a *B. parapertussis* z čeledi *Alcaligenaceae* jsou původci pertuse (známe také jako černý kašel) a parapertuse, onemocnění velmi závažného, když postihne děti v kojeneckém věku. Obě onemocnění byla pokládána za vymýcená díky rozsáhlým očkovacím plánům. V poslední době se onemocnění znovu objevuje a to ve skupině ještě neočkovaných kojenců a dospívající mládeže. Hlavní příčinou může být nedostatečný ochranný efekt očkování a narůstající cestovní ruch ze zemí, kde není vakcinace zcela běžná. Důvodem pro vývoj rychlé metody je zejména senzitivita standardní kultivační metody. Drobné a pomalu rostoucí kolonie bordetel jsou často utlačeny fyziologickou florou dutiny ústní i přes antibiotika přidávaná do kultivačního média. Kultivace trvá tři až sedm dní. Celkově, tato metoda má nízkou účinnost a je velmi zdoluhavá. Naneštěstí je velmi podstatné rozpoznat příčinné agens včas. Antibiotika jsou schopná zmírnit a zkrátit průběh onemocnění pouze tehdy, jsou-li podána v první fázi onemocnění. V pokročilém stádiu onemocnění již není možné jeho délku a průběh ovlivnit jakoukoli léčbou.

Detekce je založena na „end-point“ polymerasové řetězové reakci. Pro detekci *B. pertussis* byla použita inserční sekvence *IS481* a sekvence pro pertusový toxin pro potvrzení. Inserční sekvence má vyšší citlivost, ale nachází se i v genomu *B. holmesii*. Pro detekci *B. parapertussis* byla vybrána inserční sekvence *IS1001*, která není nalézána u jiných druhů. Jako inhibiční kontrola byl vybrán gen pro lidský beta-globin. Konečná detekce je horizontální agarosovou elektroforesou. Vyvíjená metoda je tedy schopna rozlišit *B. pertussis* a *B. parapertussis* v jediném reakčním kroku. Takto jsou splněny nároky na rychlou, jednoduchou a spolehlivou metodu pro rutinní mikrobiologickou laboratoř.

RNDr. Jan Křístek, CSc.

Karlovarské imunologické centrum, s.r.o.
Bezručova 10
360 01 Karlovy Vary

tel.: +420 353 228 907
e-mail: j.kristek@email.cz

Detekce *Chlamydia trachomatis* ve výtěrech ze spojivkového vaku pomocí PCR

Křístek J.¹, Studený P.², Dědková B.², Šinovská L.¹, Hošková J.¹

¹Karlovarské imunologické centrum, s.r.o.,

²Karlovarská krajská nemocnice, a.s., oční odd. Sokolov

Chlamydia trachomatis je patogen, zodpovědný za řadu onemocnění urogenitálního systému. Kromě toho, způsobuje řadu závažných očních onemocnění :

- v rozvojových zemích - mimo jiné, v důsledku špatné hygieny způsobuje trachom, který vede ke slepotě.
- ve vyspělých zemích vyvolává inkluzní konjunktivitidu dospělých a ophthalmia neonatorum u dětí infikovaných matkou při porodu- purulentní zánět spojivek, který pokud není léčený může vést ke slepotě.

Laboratorní diagnostika je založena na nepřímém průkazu specifických protilátek a na přímém průkazu patogena. Z metod umožňujících přímý průkaz patogena má nejvyšší senzitivitu a specificitu PCR a proto jsme tuto metodu použili k detekci *Chlamydia trachomatis* u pacientů s inkluzní konjunktivitidou.

Bylo vyšetřeno 115 pacientů s klinickými příznaky inkluzní konjunktivitidy. Kontrolní skupinu představovalo 29 zdravých osob, bez zjevných příznaků konjunktivitidy. U pacientů a kontrolních osob byl proveden výtěr ze spojivkového vaku tamponem, který byl zanořen do odběrového média. Z těchto vzorků byla izolována DNA podle Bergmana et. al. 2002. Pro detekci *C. trachomatis* jsme vyvinuli vlastní in house metodu. Finální produkt cca 245 bp. byl detekován ELFO v 2% agarózovém gelu s vizualizací Ethidium bromidem v UV oblasti. Citlivost detekce dle kontrolních vzorků Q.C.M.D. se pohybovala kolem 5 kopií v 1 ml vzorku.

Ze 115 vyšetřených pacientů jsme DNA *C. trachomatis* detekovali v 61 vzorcích., což představuje 61% . Na základě těchto výsledků můžeme uzavřít, že *C. trachomatis* je hlavním patogenem v případě inkluzní konjunktivitidy. Vzhledem k tomu, že DNA *C. trachomatis* byla rovněž prokázána i u 4 bezpříznakových jedinců bude nutné kvantitativně stanovit minimální počet chlamydií, který může vyvolat zánětlivé onemocnění očí.

Mgr. Petra Pospíšilová

Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity
Biologický ústav
Kamenice 5
625 00 Brno

tel.: +420 549 495 353
e-mail: matej@med.muni.cz

Molekulární detekce syfilis: PCR diagnostika, typizace a detekce makrolidové rezistence u *Treponema pallidum*

Pospíšilová P., Šmajš D.
Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Brno

Zlatý standard diagnostiky syfilis představuje serologie. Serologické reakce ovšem neumožňují získat informace užitečné pro epidemiologický kontext tohoto onemocnění. Bakterii *Treponema pallidum* nelze kultivovat v podmínkách *in vitro* a proto nelze aplikovat klasický přístup pro určení rezistence k antibiotikům. Molekulární detekce genetického materiálu původce syfilis stále představuje nadstandardní vyšetření zejména kvůli limitacím jejího použití (nutnost získání materiálu obsahujícího treponemální DNA), nicméně tento přístup umožňuje typizaci klinických izolátů a detekci stále častěji se vyskytující rezistence *T. pallidum* k makrolidovým antibiotikům.

Primární detekce genetického materiálu *T. pallidum* u klinických vzorků zahrnovala dvoukrokovou PCR dvou nezávislých treponemálních lokusů (*poIA* = TP0105 a *tmpC* = TP0319). U pozitivních vzorků byly opět dvoukrokovým PCR protokolem amplifikovány sekvenčně variabilní úseky hypotetických genů TP0136 a TP0548 a lokus 23S rDNA. Amplikony hypotetických genů byly sekvencovány dideoxynukleotidterminátorovou metodou s pomocí původních amplifikačních a interních sekvenačních primerů. Amplikon 23S rDNA byl podroben restričnímu testu *Mbo* II/*Bsa* I s cílem zjistit přítomnost mutací A2058G a A2059G podmiňujících rezistenci k makrolidům.

V letech 2005-2008 bylo shromážděno 51 PCR pozitivních klinických vzorků od 37 pacientů z různých regionů České republiky. Pokud jde o typ klinického materiálu, bylo vyšetřeno 37 stěrů z kožních a slizničních lezí, 12 vzorků plné krve, 1 sérum a 1 mozkomíšní mok. Výsledky vyšetření jednotlivých lokusů ve vzorcích téhož pacienta byly ve všech případech plně shodné. Sekvence lokusů TP0136 a TP0548 ve všech vyšetřených izolátech byly buď identické nebo velmi podobné příslušným sekvencím kmene SS14. Žádný z izolátů nebyl sekvenčně podobný kmeni Nichols. U 5 pacientů se nepodařilo tyto lokusy amplifikovat nebo úspěšně sekvencovat. U 26 pacientů byly nalezeny sekvence TP0136 a TP0548 identické s kmenem SS14. U 6 pacientů byly nalezeny ve vyšetřovaných lokusech sekvence blízké kmeni SS14, přičemž 2 z nich byly totožné. 22 pacientů (59,5 %) bylo infikováno kmenem *T. pallidum* senzitivním k makrolidům a 15 kmenem makrolid-rezistentním, přičemž 8 těchto pacientů (21,6 %) neslo kmen obsahující mutaci A2058G a 7 z nich (18,9 %) kmen s mutací A2059G, která dosud nebyla popsána. U jednoho z těchto pacientů bylo

zaznamenáno selhání léčby makrolidovým preparátem obsahujícím spiramycin. Pro nový typovací systém byla navržena kombinace lokusů TP0136 a TP0548 s lokusem makrolidové rezistence.

Zavedli jsme nový typovací systém s diskriminační schopností 8 subtypů u vzorků od 32 pacientů. Získané výsledky dále naznačují, že geneticky kódovaná rezistence k makrolidům je u syfilis v České republice relativně častá (36,4 %). Tato vysoká pravděpodobnost selhání léčby makrolidy zdůrazňuje nutnost následné kontroly úspěšnosti léčby u pacientů se syfilis.

Podporováno granty IGA MZ ČR č. NR/8967-4/2006 a GAČR č. 310/07/0321.

Mgr. Jiří Štika, Ph.D.

BIO-PLUS, spol. s r.o.
Polní 23/25
639 00 Brno

tel.: +420 545 422 096
e-mail: jisti@quick.cz

Zavedení automatické izolace RNA pomocí zařízení Magna Pure Compact pro stanovení virové nálože HCV přístrojem COBAS TaqMan

Štika J. BIO-PLUS, spol. s r.o., Brno

Úvod:

Pro přístroj COBAS TaqMan 48 (Roche) je validována souprava COBAS TaqMan HCV Test (Roche) v kombinaci s manuální izolací nukleových kyselin systémem High Pure (Roche), nebo s automatickou izolací na zařízení AmpliPrep (Roche). AmpliPrep však není vhodný pro středně velké a menší laboratoře. Také těmto laboratořím by automatická izolace výrazně usnadnila práci, ušetřila čas a přinesla větší spolehlivost a přesnost. Z tohoto důvodu jsme srovnávali účinnost izolace na automat MagNA Pure Compact (Roche) s výše uvedenou manuální izolací.

Metody:

Citlivost byla srovnávána pomocí pozitivního vzorku, ze kterého byly ředěním negativním sérem připraveny vzorky o koncentraci na hranici detekce testu. Z těchto vzorků byla pomocí obou izolací paralelně izolována RNA a společně detekována přítomnost RNA HCV prostřednictvím COBAS TaqMan. Kvalitativní hodnocení po obou izolacích bylo srovnáváno na šestičlenné ředící řadě o koncentraci $10^6 - 10^0$ IU/ml.

Výsledky:

Při hodnocení citlivosti jsme v 5 pokusech vyhodnotili 19 vzorků. Po manuální izolaci bylo 6 vzorků pozitivních, po automatické izolaci bylo pozitivních 7 vzorků. U 14 vzorků jsme obdrželi shodný výsledek, 2 vzorky byly pozitivní jen po manuální izolaci, naopak 3 vzorky byly pozitivní jen po automatické izolaci. Po obou dvou izolacích jsme obdrželi vzájemně si odpovídající kvantitativní výsledky v celém rozsahu ředící řady (2 pokusy).

Závěr:

Automatická izolace na izolačním zařízení MagNA Pure Compact vykazuje obdobnou účinnosti izolace a poskytuje srovnatelné kvantitativní výsledky jako výrobcem doporučená izolace manuální. Automatická izolace je navíc spolehlivější a poskytuje konzistentnější výsledky a je tedy možné ji zavést do laboratorní praxe pro detekci genomu HCV.

Ing. Barbara Brežná, Ph.D.

Výskumný ústav potravinársky
Priemyselná 4
P. O. Box 25
824 75 Bratislava
Slovensko

tel.: +421 250 237 157
e-mail: brezna@vup.sk

Diverzita kvasiniek a plesní vo vzorkách slovenského hrozna a muštu.

Brežná B., Kuchta T.
Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 82475 Bratislava, SR

Z dvoch najbežnejších slovenských odrôd hrozna Frankovka modrá a Veltlín boli pripravené modelové vzorky ktoré pozostávali z výluhu z hroznových bobúľ, čerstvo lisovaného muštu, muštu po 7-10 dňovej fermentácii a plne fermentovaného muštu po filtrácii. S cieľom skúmať zastúpenie eukaryotických mikroorganizmov nekultivačnou metódou bola z týchto vzoriek izolovaná DNA, ktorá sa použila ako templát v PCR s univerzálnymi primermi pre huby orientovanými na vnútornú medzerníkovú oblasť (Internal transcribed spacer, skratka ITS) medzi génmi pre 5,8s a 26s ribozomálnu RNA. Fluorescenčné označenie jedného z primerov a použitie kapilárnej elektroforézy s laserovou detekciou umožnilo zistenie presnej veľkosti PCR produktov, ktorá je druhovo špecifická. Najvýraznejšie PCR produkty boli klonované a sekvenované. Identifikácia jednotlivých PCR produktov bola doplnená údajmi z paralelnej štúdie, kde sa z rovnakých vzoriek kultivovali kvasinky, pričom ich ITS-PCR profily boli porovnané s profilmi celkovej DNA hroznových výluhov a muštov. Druhové zastúpenie zistené na základe oboch metód pozostávalo z *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia chrysoperlae*, *Candida zemplinina*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporoides*, *Botryotinia (Botrytis) sp.*, *Alternaria alternata*, *Saccharomyces sp.*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentas*, *Candida railenensis*, *Rhodospiridium (Rhodotorula) sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Uncinula (Erysiphe) necator*, *Debaryomyces hansenii* a *Issatchenkia terricola*.

RNDr. Tomáš Kuchta, DrSc.

Výskumný ústav potravinársky
Priemyselná 4
P. O. Box 25
824 75 Bratislava 26
Slovensko

tel.: +421 250 237 167
e-mail: kuchta@vup.sk

Využitie pšenice ako interného štandardu pri analýze pekárskych výrobkov metódou real-time PCR

Kuchta T., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 82475 Bratislava, SR

Polymerázová reťazová reakcia s priebežnou fluorometriou (real-time PCR) umožňuje analýzu potravinárskych výrobkov z hľadiska prítomnosti rastlinných druhov, čo má význam pri dôkaze alergénov a pri autentifikácii potravín. Vzhľadom na principiálne problémy s izoláciou DNA z potravinárskych výrobkov a tiež na možné zlyhanie PCR v jednotlivých vzorkách z technických príčin, je potrebné vždy používať interný štandard. Pri analýze pekárskych výrobkov s orechovou plnkou sme použili trojicu duplexných real-time PCR, kde prvý systém bol špecifický pre vlašské orechy, lieskovce resp. arašidy a ako duplexný partner sa použila real-time PCR špecifická pre pšenicu. Takéto usporiadanie preukázalo vhodnosť na kontrolu amplifikovateľnosti DNA a správneho priebehu PCR.