



ODBORNÁ KONFERENCE

**RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI 2008**

RANK 2008

**23. a 24. leden 2008
v prostorách hotelu Zlatá štika, Pardubice**

SBORNÍK SDĚLENÍ

www.rank.cz

Hlavní sponzor



Další sponzoři



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

PROGRAM ODBORNÉ KONFERENCE

**RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI 2008
RANK 2008**

23. a 24. leden 2008

v prostorách hotelu Zlatá štika, Pardubice

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

23.ledna 2008 středa

10.00 – 12.30 Registrace

13.00 – 13.15 Zahájení

13.15 – 14.50 Analýza humánního genomu
předsedající : MUDr. F. Musil, Ing. A. Bóday

Prof. Ing. Rudolf Poledne, CSc. a kol., Pracoviště pro výzkum aterosklerózy, IKEM
Praha:

Ateroskleróza - genetická determinace (25 min.)

Ing. Dalibor Novotný, Ph.D., OKB FN, Olomouc:

Analýza kandidátních genů pro aterosklerózu (15 min.)

RNDr. Běla Bendlová, CSc., Endokrinologický ústav, Oddělení molekulární
endokrinologie, Praha:

Genetické příčiny endokrinopatií a jejich diagnostika (20 min.)

Mgr. Eva Průšová a kol., Onkologické centrum J.G. Mendela, Laboratoř molekulární
biologie, Nový Jičín:

**Jaké mohou být konce u Marfanova syndromu z pohledu molekulární genetiky
(15min.)**

14.50 – 15.00 Přestávka

15.00 – 15.50 Blok speciál
předsedající : Ing. D. Novotný, Ph.D., RNDr. J. König

RNDr. Zbyněk Urban a kol., Policie ČR, Správa VČ kraje, Odbor kriminalistické
techniky a expertiz, Hradec Králové:

**Prezentace Odboru kriminalistické techniky a expertiz Správy VČ kraje Policie
ČR a forenzní genetiky (20 min.)**

MUDr. Václav Chmelík, Infekční oddělení, Nemocnice České Budějovice, a.s.:
Diagnóza infekční nemoci a význam laboratorního vyšetření (20 min.)

15.50 – 16.00 **Přestávka**

16.00 – 17.45 **Komerční diagnostika a technika**
předsedající : Ing. F. Štumor, Mgr. M. Zemánek, Ph.D.

Roche s.r.o. (15 min.)

Bio-Consult Laboratories spol. s r.o. (10 min.)

APPLERA Česká republika s.r.o. – Applied Biosystems (10 min.)

BAG Health Care GmbH (10 min)

IMMUNOTECH a.s. (10 min)

LABOSERV s.r.o. (10 min)

AscoMed s.r.o. (10 min)

LACOMED, spol. s r.o., Praha (10 min)

DYNEX TECHNOLOGIES, spol. s r.o. (10 min)

19.30 – 23.00 **společenský večer v hotelu Zlatá štika**

24. ledna 2008 **čtvrtek**

8.30 – 9.20 **Vybrané aplikace I.**
předsedající : Ing. M. Pejchalová, Ph.D., Mgr. P. Králík, Ph.D.

Ing. Barbara Brežná, Ph.D., Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, Slovenská republika:

Metodické požiadavky na polymerázovú reťazovú reakciu pri detekcii alergénov v potravinách (15 min.)

RNDr. Tomáš Kuchta, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, Slovenská republika:

Metodické požiadavky na polymerázovú reťazovú reakciu v aplikácii na rutinnú identifikáciu patogénnych baktérií v potravinách (15 min.)

Mgr. Petra Vašíčková a kol., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno:
Virus hepatitidy E jako původce alimentárního onemocnění (10 min.)

Mgr. Jiří Štika, Ph.D. a kol., BIO-PLUS, spol. s r.o., Brno:
Detekce mykoorganismů v krvi dětských febrilních imunokompromitovaných pacientů pomocí PCR-RFLP (10 min.)

9.20 – 9.30 **Přestávka**

9.30 – 10.50 **Analýza nukleových kyselin v péči o ženu**
předsedající : Doc. RNDr. V. Buchta, CSc., MUDr. Z. Medková, Ph.D.

MUDr. Zuzana Medková, Ph.D. a kol., Klinické laboratoře IFCOR – 99, s.r.o., Brno:
Aktuální výskyt *Chlamydia trachomatis* zjištěný metodou PCR u pacientů s poruchou fertility – vlastní zkušenosti (15 min.)

RNDr. Jana Šmahelová a kol., NRL pro papillomaviry, ÚHKT, Praha:
Detekce HPV DNA u žen s hraniční cytologií ASCUS/AGC (15 min.)

Doc. MUDr. RNDr. Juraj Šimko, Ph.D. a kol., Gendiagnostica Bratislava s.r.o., Bratislava, Slovenská republika:
Nepodceňujeme nálezy mykoplaziem u gynekologických pacientok? (15 min.)

Mgr. Markéta Vydržalová a kol., Katedra biologických a biochemických věd, Univerzita Pardubice:
Průkaz *Mycoplasma hominis* v amniové tekutině těhotných žen metodou real-time PCR (10 min.)

MUDr. Petr Prášil a kol., Klinika infekčních nemocí LF a FN Hradec Králové:
Klinické zkušenosti s diagnostikou toxoplasmózy u gravidních žen sérologickými a PCR metodami (15 min.)

10.50 – 11.00 **Přestávka**

11.00 – 12.00 **Vybrané aplikace II**
předsedající : MVDr. Z. Čermáková, PhD., Ing. N. Piskunova, CSc.

PharmDr. Lenka Plíšková a kol., Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF a FN Hradec Králové:
SeptiFast a jeho místo v diagnostice sepsí (15 min.)

Mgr. Pavel Trubač a kol., Laboratoř molekulární biologie a genetiky, Nemocnice České Budějovice, a.s., České Budějovice:
Využití sekvenace 16S rRNA při identifikaci bakteriálních infekcí (10 min.)

MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D. a kol., Virologický úsek a NRL pro CMV, Ústav klinické mikrobiologie, FN a LF Hradec Králové:
Přenos CMV mateřským mlékem (10 min.)

MUDr. Petr Hubáček a kol., Klinika dětské hematologie a onkologie a Laboratoř molekulární genetiky Pediatrické kliniky 2. LF UK a FN Motol, Praha:
CMV infekce u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (15 min.)

12.00 – 12.45 **Přestávka na oběd**

12.45 – 13.40

předsedající :

Vybrané aplikace a kasuistiky

MUDr. M. Förstl, MUDr. P. Prášil

Mgr. Radka Bolehovská a kol., Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové:

Validace in-house PCR pro průkaz DNA *Borrelia burgdorferi sensu lato*
(15 min.)

MVDr. Zuzana Čermáková, Ph.D. a kol., Ústav klinické mikrobiologie, FN Hradec Králové:

Laboratorní diagnostika infekcí patogenními leptospirami člověka (15 min.)

Méně obvyklé infekce CNS – kasuistiky:

Svobodová M., Bareková L., Šturm F.:	Kasuistika I. (5 min.)
Förstl M., Voxová B., Kohout A., Plíšková L.:	Kasuistika II. (5 min.)
Buchta V., Mlynář J.:	Kasuistika III. (5 min.)

13.40-13.50

Přestávka

13.50 – 14.30

předsedající :

Mykobakteriální infekce

PharmDr. L. Plíšková, MUDr. H. Podivínská

Mgr. Petr Králík, Ph.D., Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno:

Atypické mykobakteriózy u lidí (10 min.)

Mgr. Radka Příbylová a kol., Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno:

Studium expresních profilů u *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
(10 min.)

Mgr. Iva Slaná a kol., Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. Brno:

Infekce TBC u psa domácího – kasuistika (5 min.)

Mgr. Monika Morávková a kol., Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno:

Infekce TBC u prasete domácího – kasuistika (5 min.)

14.30 – 14.50

Diskuse

14.50

Ukončení

Prof. Ing. Rudolf Poledne, CSc.

Institut klinické a experimentální medicíny
Vídeňská 1958/9
140 21 Praha 4

tel.: +420-261 362 729

e-mail: rudolf.poledne@ikem.cz

Genetická determinace aterosklerózy

Poledne R., Hubáček J., Piha J.

Centrum výzkumu chorob srdce a cév, IKEM, Praha

S použitím metod molekulární genetiky se začíná objasňovat podstata pozitivní rodinné anamnézy kardiovaskulárních nemocí (KVN). Známe několik mendeliánských poruch, které významně urychlují rozvoj aterosklerózy. Převážná většina genetické podstaty rizikových faktorů tohoto onemocnění (větší vnímavosti k negativním vnějším vlivům) a jejich klinických komplikací (infarkt myokardu a mozková mrtvice) je ale výrazně polygenních. V rámci asociační analýzy jsme porovnávali více než dvacet běžných polymorfizmů v lokusech kandidátních genů pro hypercholesterolemii u skupiny hypercholesterolemických dětí s dětmi s cholesterolemii v optimálním rozmezí. Z nalezených signifikantně významných genotypových rozdílů se část potvrdila i na jiných populacích. Přínos jednotlivých kandidátních genů hypercholesterolemie byl ale malý, největší vliv (5-7%) měl polymorfismus v genu pro apoprotein E.

V české populaci výrazně poklesla mortalita na infarkt myokardu (IM). Sledováním reprezentativního vzorku české populace jsme zjistili, že zásadní vliv měl pokles cholesterolemie (vlivem změny diety), která poklesla v celé populaci o 12 %. Analýzou prospektivně sledované kohorty jsme zjistili významné individuální rozdíly v poklesu cholesterolemie v závislosti na polymorfismu v promotoru genu pro CIP7A1 (gen pro klíčový enzym v přeměně cholesterolu na žlučové kyseliny). Tento epidemiologický nálezn jsme potvrdili v kontrolované klinické studii na dobrovolnících a mechanismus vlivu analyzovali genovou expresí na experimentálním modelu Pražského hereditárně hypercholesterolemického potkana.

Současný vývoj molekulární genetiky umožňuje rozšíření asociačních studií na stovky genů. V probíhající studii budeme srovnávat 1500 pacientů s infarktem myokardu (IM) ve věku do 65. let s reprezentativním souborem české populace. Dosud publikované podobné analýzy zatím ukazují, že i při těchto rozsáhlých analýzách je vliv jednotlivých genů malý a dosud se nepodařilo identifikovat žádný gen, který by zásadně určoval podstatu pozitivní rodinné anamnézy.

V posledních dvou letech byla na třech předních pracovištích použita analýza celého lidského genomu pro hledání determinace IM. Tento přístup nepředpokládá žádnou predispozici konkrétních kandidátních genů, ale hledá nezávislé rozdíly mezi patologickou skupinou a kontrolami. Dvě skupiny nezávisle došly ke shodě, že pro IM je určující malá část 9. chromozomu. Je ale překvapivé, že v tomto místě není ani jeden z genů predisponujících k hypertenzi, hyperlipoproteinémii, či citlivosti k inzulinu.

Domníváme se, že tyto nálezy naznačují, že určení genetické predispozice ke KVN je zatím mnohem dále, než jsme předpokládali v době objasnění struktury celého lidského genomu.

Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.

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

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

Analýza kandidátních genů pro aterosklerózu

Novotný D.¹, Vaverková H.²

¹Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc,

²III.interní klinika lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Olomouc

Aterogeneze je komplexní proces, který obsahuje podíl několika patofyziologických subsystémů. Předpokládá se, že genetická predispozice k onemocnění spojená s aterosklerózou zahrnuje celou řadu genů. Jejich role je však objasněna pouze u mála z nich. Ještě méně je známo o interakcích gen-gen a gen-vnější prostředí. V některých rodinách lze určit spojitost onemocnění s jediným, tzv. majoritním genem (monogenní onemocnění), např. u familiární hypercholesterolemie. U většiny dalších případů má vliv na predispozici k ateroskleróze jedna nebo více variant tzv. minoritních genů (multigenní onemocnění). Zřejmá je zvláště komplexnost vztahu genetiky a aterosklerózy a obtížnost určení prediktivní hodnoty pro jednotlivé genetické rizikové markery. Navíc se doposud málo pozornosti věnuje úloze protektivních genů, které poskytují „ochranu“ i jedincům s vysokým rizikem kardiovaskulárních onemocnění.

K identifikaci genetických komponent aterosklerózy existuje několik přístupů. Jeden z nich používá termín „kandidátní gen“ a informací z předchozích biochemických a klinických studií. Na základě těchto údajů jsou zjišťovány markery pro kandidátní geny a je studován jejich vztah k onemocnění. V současnosti je známa celá řada kandidátních genů pro studium vztahu genotyp-ateroskleróza a některé z nich budou prezentovány podrobněji v přednášce.

Sdělení zahrnuje praktické výstupy vycházející z dlouhodobé vědeckovýzkumné práce III.interní kliniky a Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc. Budou prezentovány analýzy tří genových lokusů (apolipoprotein E, cluster genů pro paraoxonázy a adiponektin) na skupinách pacientů s různou klinickou manifestací aterosklerózy. Na závěrech vyplývajících s jednotlivých studií budou demonstrovány obtíže při interpretaci získaných dat.

Přednáška prezentuje výsledky získané za podpory grantu IGA MZ ČR číslo NR/9068-3.

RNDr. Běla Bendlová, CSc.

Oddělení molekulární endokrinologie
Endokrinologický ústav
Národní 8
116 94 Praha 1

tel.: +420-224 905 287
e-mail: bbendlova@endo.cz

Genetické příčiny endokrinopatií a jejich diagnostika

Bendlová B.

Častý familiární výskyt pozorovaný u mnoha endokrinopatií nasvědčuje tomu, že jsou dědičné. Jejich příčinou je změna (mutace) genetické informace, tedy deoxyribonukleové kyseliny.

Poruchy DNA mohou být různého charakteru a rozsahu, od změny počtu chromozomů, přes strukturální poruchy, až k bodovým mutacím genu. V endokrinologii se setkáváme prakticky se všemi těmito typy genetických poruch. Některé patologické stavy jsou způsobeny mutacemi jednoho genu, to jsou tzv. monogenní onemocnění (př. MEN2A), jiné jsou způsobeny poruchami více genů zároveň a ke vzniku onemocnění navíc přispívají faktory vnějšího prostředí (př. diabetes), pak hovoříme o polygenním typu dědičnosti. U endokrinních nádorů se setkáváme i s genetickými poruchami na úrovni somatických buněk.

Rozličné genové mutace již byly nalezeny u více než 70 endokrinních onemocnění. Jsou popsány poruchy samotných hormonů nebo jejich vazebných proteinů. Další skupinu představují defekty receptorové, signálních molekul, transkripčních faktorů i enzymů. Základní endokrinologický výzkum se nyní opírá zejména o řadu molekulárně biologických a molekulárně genetických metod, které jsou stále častěji využívány i k diagnostickým účelům. Cílem sdělení je seznámit posluchače s jejich aplikacemi v endokrinologii, se zaměřením zejména na diagnostiku nádorů štítné žlázy.

Přednáška využívá některých výsledků z řešení grantů IGA MZ NR/9165-3, NR/7809-5, GAČR 301/06/P425.

Mgr. Eva Průšová

Onkologické centrum J.G. Mendela
Laboratoř molekulární biologie
Divadelní 2174
741 01 Nový Jičín

tel.: +420-556 794 233

e-mail: arpad.boday@onkologickecentrum.cz

Jaké mohou být konce u Marfanova syndromu z pohledu molekulární genetiky

Průšová E.¹, Bóday A.¹, Zlámalíková E.¹, Jalůvková E.¹, Riedlová P.¹, Kolaříková H.²,
Fišer J.², Tavandzis S.¹, Kroupová P.¹, Janýšková H.¹, Šantavá A.⁴, Kutějová R.⁵,
Kučerová M.³, Radina M.³

¹Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín, Laboratoř molekulární biologie,

²Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín, Laboratoř forenzní DNA diagnostiky, ³Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín, Laboratoř biochemie, ⁴FN Olomouc, Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, ⁵Havířov, Ambulance lékařské genetiky

Marfanův syndrom (MFS) je autozomálně dominantní onemocnění pojivových tkání s incidencí kolem 1 z 5-10 000. Až 25% případů však může být sporadických. Klinicky se MFS vyznačuje velkou variabilitou. Mezi hlavní příznaky patří poruchy kardiovaskulárního systému, zejména dilatace a disekce vzestupné aorty, očního systému – ectopia lentis, kostního systému – Pectus carinatum nebo P. excavatum a další tzv. malá diagnostická kritéria jako například arachnodaktylie.

Etiologickou příčinou tohoto onemocnění jsou mutace v genu FBN1, který je lokalizován na chromozomu 15q15-q21.1. Je prokázán i vliv genu FBN2 lokalizovaného na chromozomu 5q23- q31 a TGFBR2 na lokusu 3p22.

Na našem pracovišti je molekulární analýza genu zahájena metodou mlpa sloužící k detekci velkých delecí či duplikací v genech FBN1 a TGFBR2. Pokud není žádná delece odhalena, přistupuje se k amplifikaci všech 65 exonů genu FBN1 metodou PCR a následně probíhá elektroforetické rozdělení produktů amplifikace metodou SSCP (Single Strand Conformation Polymorfism). Exon, ve kterém SSCP odhalí konformační změnu, je poté podroben sekvenční analýze. Její výsledek je porovnáván se známou sekvencí FBN1.

Ze zkušeností získaných molekulární analýzou genu FBN1 prováděnou na našem pracovišti chceme poukázat na nutnost dodržení kvality izolace DNA, nutnost provádění konfirmačních testů a rovněž na nutnost ověřovat výsledky získané metodou mlpa pomocí jiných metodických přístupů. V souboru 100 pacientů se nám původně pomocí metody mlpa podařilo identifikovat 3 pacienty s velkou delecí exonů v genu FBN1. Konfirmační testy těchto pacientů prováděné ze vzorků DNA izolovaných z druhého nezávislého odběru periferní krve a také prediktivní testy rodinných příslušníků probandů však snížili počet pacientů s velkou delecí na jednoho.

RNDr. Zbyněk Urban

Policie ČR
Správa VČ kraje, Odbor kriminalistické techniky a expertiz
Ulrichovo náměstí 810
501 01 Hradec Králové

tel.: +420-974 521 360
e-mail: oktehk@seznam.cz

Prezentace Odboru kriminalistické techniky a expertiz Správy VČ kraje Policie ČR a forenzní genetiky

Urban. Z., Čížková J., Karaus E.

Sdělení bude obsahovat informace o struktuře pracoviště Odboru kriminalistické techniky na Správě Východočeského kraje. Dále bude pojednáno o uspořádání pracoviště forenzní genetiky, jeho personálním obsazení a přístrojovém vybavení. Předmětem sdělení bude také vyjmenování a charakteristika zpracovávaných materiálů, postupy izolace nukleových kyselin, detekce a archivace vzorků. Sdělena bude i vybraná kazuistika.

MUDr. Václav Chmelík

Infekční oddělení
Nemocnice České Budějovice, a.s.
B. Němcové 54
370 87 České Budějovice

tel.: +420-387 874 601
e-mail: chmelik@nemcb.cz

Diagnóza infekční nemoci a význam laboratorního vyšetření

Chmelík V.

Svět člověka se rychle mění. S jeho změnami souvisejí i změny ve výskytu a projevech infekcí. Některé téměř vymizely vlivem očkování, veliký vliv na kliniku nemocí má životní styl (výživa, návyky, sexuální revoluce). Obraz a pravděpodobnost vzniku infekcí pak výrazně změnila moderní medicína (invazivita, chemoterapie, imunosuprese, ekologie nemocnic). Změnila se dostupnost jakékoli části světa v reálném čase a v běžné inkubační době. Endemické infekce vzdálených světadílů se tak mohou náhle objevit v naší nemocnici.

Obraz nemocí se však změnil také proto, že jejich obětí jsou jiní lidé než v minulosti. Výrazné prodloužení života, přežívání i závažných nemocí, množství komorbidit a změněný stav imunity následkem nemocí nebo léčby jsou důvodem toho, že naši nemocní podléhají jiným agens, a nacházíme u nich odchylné příznaky oproti kdysi popisovanému obrazu nemoci.

Změnily se však také léčebné možnosti, lze použít, ale i zneužít nové skupiny léků a lze tak dosáhnout lepších výsledků léčby, ale také nežádoucích následků v ekologii ústavů.

Tvorba diagnózy infekční nemoci je kontinuálně – přetržitý proces přibližování se k pravdě: situace se mění v čase, získávání informací je sice průběžné, ale změna názoru přichází až po přijetí a etapovém zhodnocení jistého množství nových dat. Terapeutický zásah je cílem a praktickým využitím dosaženého poznání, ale může i zakrýt (dosud nepoznanou) skutečnost.

Co můžeme považovat za úplnou diagnózu infekční nemoci. Zvláště laboratorní pracovníci považují za hlavní diagnózu etiologickou - tedy záchyt nějakého mikroorganismu. Tato představa je však mylná. Zachycený mikroorganismus může být výsledkem kontaminace v předanalytické i analytické fázi vyšetření, správně zachycený mikroorganismus může být neškodným komensálem nebo kolonizujícím organismem, stejně jako vyvolavatelem příznaků. O nemocném tedy musíme vědět mnohem více: klinický lékař musí pojmenovat příznaky nemoci: postižený orgán, způsob a míru postižení, tedy syndrom, důležité je poznání, jak závažný je stav, zda jsou projevy fokální infekce, nebo známky celkové reakce organismu (SIRS, sepse, těžká sepse, septický šok). Pro rozhodování o tom jaká léčba, jak rychle a v jaké intenzitě má být podána, je pak nesmírně důležitý věk nemocného a přidružené nemoci (komorbidity).

Diagnóza infekční nemoci tedy není totožná s laboratorním výsledkem. Je výsledkem komplexního zhodnocení klinických příznaků, laboratorních, zobrazovacích a jiných vyšetření. Jednou z důležitých úloh klinického pracoviště je indikace takových vyšetření, která vedou k potvrzení, doložení syndromologické diagnózy, záchytu

původce a zjištění jeho citlivosti na dostupnou chemoterapii. Indikace vyšetření je položením cílené otázky laboratoři. To má stránku informační (žádanka, jiná komunikace), technickou (vlastní provedení odběru, kvalita uchování a transportu materiálu) i ekonomickou. Úloha laboratoře (zvláště laboratoře zaměřené na identifikaci původce) je na tuto otázku odpovědět, dle dostupných informací rozvinout diferenciálně diagnostické možnosti laboratoře a interpretovat získaná data. Klinik pak provádí další interpretaci získaných výsledků a je oprávněn výsledkem, který je zcela v rozporu s klinickým nálezem upřesnit jinými metodami, někdy i zdůvodněně odmítnout. Na každém z kroků tohoto procesu vznikají chyby ! Jejich odhalení je často velmi obtížné a jejich důsledkem může být stanovení chybné diagnózy i zbytečné léčení antibiotiky. Snížit výskyt preanalytických, analytických a interpretačních chyb musí být naším každodenním úkolem. Dosáhnout toho můžeme jen ve vzájemné přátelské a otevřené komunikaci mezi klinikem a laboratorním pracovníkem.

Ing. Barbara Brežná, Ph.D.

Výskumný ústav potravinársky
Priemyselná 4
824 75 Bratislava

tel.: +421-250 237 158
e-mail: brezna@vup.sk

Metodické požiadavky na polymerázovú reťazovú reakciu pri detekcii alergénov v potravinách

Brežná B.

Potravinové alergie predstavujú v civilizovanom svete problém, ktorého význam stále rastie. Približne 3 – 4 % dospelých populácie a vyše 6 % detí trpí alergiou na nejakú potravinu. Kvôli ochrane alergikov je na potravinárskych výrobkoch povinné označovanie ich zloženia, najmä čo sa týka prítomnosti častých pôvodcov alergií. Taktiež sa vyvíjajú analytické metódy na dôkaz alergénov, aby bolo možné kontrolovať pravdivosť takéhoto označenia. Metódy dôkazu alergénov sú väčšinou založené priamo na dôkaze bielkoviny (imunologické metódy), alebo na dôkaze DNA (PCR metódy). Pre rutinnú použiteľnosť PCR je potrebné splniť viacero požiadaviek. V posledných rokoch sa podarilo splniť požiadavky definovanej selektivity, zábrany kontaminácie a kontroly úspešnosti amplifikácie jednotlivých vzoriek. Požiadavka definovanej selektivity sa splnila konfrontáciou primérov a sond s verejnou databázou sekvencií DNA a empirickou validáciou PCR-systémov z hľadiska inkluzivity a exkluzivity. Požiadavka zábrany kontaminácie sa splnila nahradením otvorených systémov využívajúcich elektroforézu uzavretými systémami s priebežnou fluorometriou (real-time PCR) a taktiež použitím enzýmu uracil-DNA glykozyláza v kombinácii s dUTP. Požiadavku kontroly úspešnosti amplifikácie jednotlivých vzoriek v našom laboratóriu riešime použitím externých amplifikačných kontrol. Požiadavky, ktoré ešte nie sú celkom splnené, sú zabezpečenie vysokej citlivosti v potravinovej matrici a kvantifikácia. Požiadavku vysokej citlivosti v potravinovej matrici je možné splniť tak, že sa ako marker použije viackópiový gén. Zavedenie kvantifikácie je v prípade dôkazu alergénov pomocou PCR stále problematické. Za najvhodnejší spôsob v súčasnosti považujeme pridávanie externých štandardov do vzorky pred jej spracovaním.

RNDr. Tomáš Kuchta, CSc.

Výskumný ústav potravinársky
Priemyselná 4
824 75 Bratislava

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

Metodické požiadavky na polymerázovú reťazovú reakciu v aplikácii na rutinnú identifikáciu patogénnych baktérií v potravinách

Kuchta T.

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je vysokocitlivá, vysokoselektívna a rýchla metóda na analýzu DNA, ktorá je v princípe vhodná na identifikáciu patogénnych baktérií v potravinách. Pre jej rutinnú použiteľnosť je však potrebné splniť viacero požiadaviek. V posledných rokoch sa podarilo splniť požiadavky definovanej selektivity, zábrany kontaminácie a kontroly úspešnosti amplifikácie jednotlivých vzoriek. Požiadavka definovanej selektivity sa splnila konfrontáciou primérov a sond so stále sa rozširujúcou databázou sekvencií DNA a zavedením štandardov validácie PCR-systémov z hľadiska inkluzivity a exkluzivity. Požiadavka zábrany kontaminácie sa splnila nahradením otvorených elektroforézou využívajúcich systémov uzavretými systémami s priebežnou fluorometriou (real-time PCR). Požiadavka kontroly úspešnosti amplifikácie jednotlivých vzoriek sa splnila používaním interných amplifikačných kontrol. Požiadavky, ktoré ešte nie sú celkom splnené, sú zabezpečenie vysokej citlivosti v potravinovej matrici, kvantifikácia a rozlíšenie mŕtvych buniek. Požiadavku vysokej citlivosti v potravinovej matrici je možné splniť predradením jednostupňového alebo dvojstupňového kultivačného rozmnoženia. Požiadavku kvantifikácie je možné splniť kombináciou PCR s metódou najpravdepodobnejšieho počtu (MPN) alebo použitím kvantitatívnej separácie bakteriálnych buniek z potravinovej matrice. Na splnenie požiadavky rozlíšenia mŕtvych buniek bola navrhnutá metóda na rozklad DNA v mŕtvych bunkách použitím etídiummonoazidu, avšak sú s ňou nejednoznačné skúsenosti.

Mgr. Petra Vašíčková

Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70
621 00 Brno

tel.: +420-533 331 611
e-mail: vasickova@vri.cz

Virus hepatitidy E jako původce alimentárního onemocnění

Vašíčková P.^{1,2}, Králík P.², Widén F.³, Pavlík I.², Smítalová R.², Bendová J.², Pšikal I.²

¹ Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

² Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

³ The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden

Alimentární onemocnění představují celosvětový problém, spektrum jejich původců je široké (od různých parazitů přes střevní bakterie až k virům a prionům). Za nejčastější agens takovýchto infekcí jsou považovány viry. Skupina virů přenosných potravinami zahrnuje nejen lidské, ale také zvířecí patogeny se zoonotickým potenciálem. Právě díky těmto schopnostem se v současné době zaměřuje stále větší pozornost na virus hepatitidy E (HEV).

Dosud byl v evropských zemích zaznamenán u lidí spíše sporadický výskyt onemocnění vyvolaného HEV. To bylo převážně spojováno s pobytem pacientů v rizikových oblastech výskytu HEV, kterými jsou rozvojové země Asie, Afriky, Jižní a Střední Ameriky. Data, která spojují tuto infekci s konzumací syrového nebo nedostatečně tepelně upraveného vepřového a jeleního masa, případně vnitřností, svědčí o zoonotickém potenciálu HEV. Tento způsob přenosu byl potvrzen detekcí infekčních virových částic ve vepřových játrech dostupných v obchodní síti v USA.

Dle oficiálních údajů Státního zdravotního ústavu (SZU) počet zaznamenaných případů hepatitidy E u obyvatel České republiky stoupá (ČR), což může být zapříčiněno otevřením hranic ČR, zároveň však nelze vyloučit možnost přenosu HEV potravinami vepřového původu přímo v obchodní síti ČR.

Na základě výše uvedených informací byla ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v. v. i. v Brně zavedena metodika detekce HEV v biologických vzorcích prasete domácího a provedena pilotní studie výskytu tohoto viru jak u jatečných zvířat, tak přímo v českých chovech.

Práce byla provedena s podporou grantu Ministerstva zemědělství České republiky MZE0002716201 a EU projektů Grant Cost Action 929 ENVIRONET a PathogenCombat.

Mgr. Jiří Štika, Ph.D.

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

tel.: +420-543 422 096
e-mail: jisti@quick.cz

Detekce mykoorganismů v krvi dětských febrilních imunokompromitovaných pacientů pomocí PCR-RFLP

Štika J., Štěrba J.

Mykoorganismy mohou být příčinou vážných až životohrožujících systémových infekcí u imunokompromitovaných pacientů. Polymerázovou řetězovou reakci (PCR) s následnou analýzou restričních fragmentů (RFLP) jsme využili k detekci mykoorganismů v krvi dětských febrilních imunokompromitovaných pacientů. V průběhu 25 měsíců jsme vyhodnotili 1072 vzorků krve od 152 pacientů (průměrně 7 vzorků/pacient). Detekováno bylo 6,3 % pozitivních vzorků (68/1072). V rámci pacientů byla pozitivita 29,6 % (45/152): u 30 pacientů byl vyhodnocen 1 pozitivní vzorek, u 9 pacientů 2 pozitivní vzorky, u 4 pacientů 3 pozitivní vzorky a u 2 pacientů 4 pozitivní vzorky. Byla zaznamenána shoda s klinickým stavem pacientů, která bude v příspěvku diskutována. Detekce mykoorganismů pomocí PCR se u imunokompromitovaných pacientů jeví jako potenciálně přínosná.

MUDr. Zuzana Medková, Ph.D.

IFCOR-99, s.r.o.
615 00 Brno

tel. : +420-604 951 227
e-mail: medkova@ifcor.cz

Aktuální výskyt *Chlamydia trachomatis* zjištěný metodou PCR u pacientů s poruchou fertility - vlastní zkušenosti

Medková Z.¹, Rumpík D.², Flek F.¹, Kintr J.¹, Klesnilová L.¹

¹ Klinické laboratoře IFCOR – 99, s.r.o., Brno

² Klinika reprodukční medicíny a gynekologie, Zlín

Urogenitální infekce způsobené *Chlamydia trachomatis* patří k celosvětově nejrozšířenějším sexuálně přenosným nákazám u obou pohlaví. Promořenost populace dosahuje v našich podmínkách dle různých zdrojů až 10%, liší se v závislosti na věku a míře sexuálního rizika. Vzhledem k oligosymptomatickým příznakům, a tedy neodhalením a neléčením akutní infekce (u žen cervicitída, u mužů uretritída) mají urogenitální chlamydiózy závažné důsledky. U žen jsou nejčastější příčinou chronických zánětů malé pánve (PID) s adnexitídou, endometritídou až peritonitídou a mnohočetnými adhezemi různého rozsahu a lokalizace. Častý je vznik extrauterinních gravidit. Muži jsou po iniciální uretritídě často postiženi epididymitídou, orchitídou a prostatitídou. Chronické urogenitální chlamydiózy vedou u obou pohlaví k závažným poruchám fertility. V případě infekce spermií se navíc zvyšuje riziko adnexální infekce u partnerky (přímý transport patogena do horních etáží genitálu). Zlatým standardem průkazu chlamydií je metoda PCR detekující s vysokou citlivostí a specificitou nukleovou kyselinu patogena. Lze jí testovat cervikální a uretrální výtěry, ejakulát, materiál odebraný per laparoscopiam a další druhy klinických vzorků. Materiál z jednoho stěru lze využít na paralelní diagnostiku více patogenů (*Neisseria gonorrhoeae*, *M. genitalium*, HPV, CMV atd.). V prezentovaném souboru pacientů - klientů IVF centra - byla zjištěna přítomnost infekce v endocervikálních stěrech u 4,8% žen (avšak z nich v 17.5% případů u žen s dg. ženská neplodnost!) a v ejakulátech 2,3% mužů s poruchou fertility. Klinický materiál z laparoskopii nebyl v souboru testován, recentní publikované zkušenosti však uvádějí až 23,6% výskyt chlamydií u laparoskopovaných pacientek (Šimko et al. 2002).

Prezentovaná data podtrhují již dříve dokumentovaný zdravotní a ekonomický význam vyšetření na přítomnost *Chlamydia trachomatis* u pacientů obou pohlaví zařazených do programů asistované reprodukce, a to v jeho iniciální fázi.

RNDr. Jana Šmahelová

Ústav hematologie a krevní transfúze
U Nemocnice 1
120 00 Praha 2

tel.: +420-221 977 103
e-mail: Jana.Smahelova@uhkt.cz

Detekce HPV DNA u žen s hraniční cytologií ASCUS/AGC

Šmahelová J.¹, Saláková M.¹, Hamšíková E.¹, Slavík V.², Rob L.³, Tachezy R.¹

¹ NRL pro papillomaviry, Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, Praha 2

² Centrum gynekologické onkologické prevence, Kateřinská 7, Praha 2

³ Gynekologicko - porodnická klinika, 2. lékařská fakulta UK, FN v Motole, Praha 5

Lidské papillomaviry (HPV) jsou etiologickým faktorem vzniku karcinomu děložního čípku, druhého nejčastějšího zhoubného nádoru u žen. Infekce HPV je ve většině případů pouze přechodného charakteru, může se projevit mírnými změnami buněk, a viry většinou spontánně vymizí. V případě přetrvávání infekce tzv. vysoko rizikovými typy (HR HPV) se prokazatelně zvyšuje pravděpodobnost progresu těchto cytologických změn do prekancerózních neoplázií děložního čípku a karcinomu.

Cílem naší studie bylo porovnat citlivost opakovaného cytologického testu versus detekce HPV DNA pro záchyt žen s nálezem závažných prekanceróz CIN2+. Porovnat citlivost a specifitu pro záchyt těchto žen v amplifikačním a neamplifikačním testu detekce HPV DNA.

Do naší studie jsme zahrnuli 651 žen s hraničními cytologickými nálezy ASCUS/AGC. U těchto žen byla při vstupu do studie provedena opakovaná cytologie, stěr z čípku pro stanovení HPV DNA a expertní kolposkopie. V laboratoři jsme detekovali HPV DNA s využitím komerčně dostupného setu Hybrid Capture 2 (hc2; Digene) a současně pomocí PCR (MY09/11) následovanou Southern blot hybridizací. Celkem 45,5% žen bylo hc2 pozitivních a 50,7% PCR pozitivních. Shoda mezi oběma metodami byla 90,9%. Pozitivita na HPV DNA stoupala se závažností cytologických a histologických nálezů. Obě metody byly dostatečně citlivé, detekovaly 90% žen, u nichž byl histologickou confirmací potvrzen nález CIN2+. Test hc2 měl vyšší specifitu, která se zvyšovala s věkem pacientek. Detekce HPV DNA měla srovnatelnou citlivost i specifitu s opakovanou cytologií. U pacientek operovaných v průběhu této studie byla zjištěná silná korelace mezi absencí HR HPV a následně normálním histologickým nálezem ve vzorku odebraném při chirurgickém zákroku.

Detekce HPV DNA u žen nad 30 let s hraničními cytologickými nálezy ASCUS/AGC by v kombinaci s Pap stěry byla vhodným nástrojem určení zvýšeného rizika nálezu CIN2+ a zároveň by zabránila nadměrným chirurgickým zákrokům u těchto žen.

Doc. MUDr. RNDr. Juraj Šimko, Ph.D.

Gendiagnostica Bratislava s.r.o.
Geologická 21
831 03 Bratislava

tel. +421-903 721 233
e-mail: simkojuraj@hotmail.com

Nepodceňujeme nálezy mykoplazmiem u gynekologických pacientok?

Šimko J., Mezenská R., Zmetáková I.

Celulárne parazity zapríčiňujú u gynekologických pacientok celý rad patologických stavov so širokou škálou klinických príznakov. Problematickou bola dlhú dobu detekcia týchto patogénov, ktoré sa len ťažko kultivujú a sú tiež veľmi citlivé na dĺžku a podmienky transportu. Výhodiskom pre presnú diagnostiku sa stali až metódy molekulárnej biológie – predovšetkým polymerázová reťazová reakcia, hybridizácia a ich vzájomné kombinácie v rozličných variantách detekčných postupov.

Pozornosť v minulých rokoch sa sústredila predovšetkým na odhaľovanie klinických dopadov prítomnosti chlamýdií - možno aj preto, že prvým a dlhodobo jediným komerčne dostupným bol kit na detekciu týchto patogénov. Mykoplazmy sa dlhú dobu považovali za menej agresívny, bezpríznakovo sa vyskytujúci „self limited“ patogén. Vznik a rýchle rozširovanie nových komerčných kitov predovšetkým na báze „real – time“ PCR umožnilo odhaliť niektoré pozoruhodné súvislosti.

Mykoplasma hominis a Ureaplasma urealyticum ako najčastejší zástupcovia mykoplazmiem sú napríklad podľa viacerých autorov najčastejšou príčinou negonokokových uretritíd.

V súbore viac ako 850 žien sme stanovovali tak prítomnosť chlamýdií, ako aj mykoplazmiem a ureaplazmiem. Mykoplazmy sme verifikovali predovšetkým ako príčiny zápalov nižších častí urogenitálneho traktu ale ich prítomnosť bola často potvrdená aj pri adnexitídach, pelvic pain a sterilitách.

Zvláštnosťou je len nepatrné (menej ako 10%) prekrývanie výskytu chlamýdií a mykoplazmiem u najčastejších gynekologických diagnóz, aj keď v spôsobe života a šírenia oboch skupín patogénov môžeme nájsť veľa podobností.

Podľa našich zistení by sa mala detekcia myko- a ureaplazmiem stať neoddeliteľnou súčasťou vyšetrovacích algoritmov u najčastejších gynekologických diagnóz.

Mgr. Markéta Vydržalová

Katedra biologických a biochemických věd
Univerzita Pardubice
Štrossova 239
530 03 Pardubice

tel.: +420-466 037 704
e-mail: marketa.vydrzalova@upce.cz

Průkaz *Mycoplasma hominis* v amniové tekutině těhotných žen metodou real-time PCR

Vydržalová M., Lysková P., Královcová D., Mazurová J., Fiedler Z.
Katedra biologických a biochemických věd, Univerzita Pardubice

Mycoplasma hominis patří mezi nejmenší mikroorganismy schopné replikace bez závislosti na živé buňce. Vyznačuje se omezenými biosyntetickými schopnostmi a malou biochemickou aktivitou odrážející jejich velmi malý genom. Diagnostika *Mycoplasma hominis* je spojena s obtížemi vyvolanými jejich nutriční a kulturační náročností a citlivostí k řadě fyzikálních a chemických faktorů prostředí.

Mycoplasma hominis je považováno za součást mikroflóry urogenitálního systému zdravého člověka. V současnosti je však dáváno do souvislosti s celou řadou akutních zánětlivých onemocnění malé pánve, je spojováno s poruchami reprodukce, potraty a nízkou porodní váhou novorozence. Míra patogenity tohoto druhu je však dosud studována. Důvodem je výskyt *Mycoplasma hominis* nejčastěji ve směsi s jinými druhy mikroorganismů, které se rovněž mohou podílet na vzniku infekčního onemocnění genitálního ústrojí žen.

Cílem práce bylo zavedení metody real-time PCR k detekci *Mycoplasma hominis* ve vzorcích amniové tekutiny těhotných žen. Detekce byla založena na průkazu genu kódujícího enzym glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasu. Metoda byla optimalizována k detekci 40 kopií genomické DNA *Mycoplasma hominis*.

Tato práce byla podpořena grantem MSM0021627502.

MUDr. Petr Prášil

Klinika infekčních nemocí LF a FN Hradec Králové
500 05 Hradec Králové

tel.: +420-495 822 220

e-mail: PPrasil@seznam.cz

Klinické zkušenosti s diagnostikou toxoplazmózy u gravidních žen sérologickými a PCR metodami

Prášil P¹, Čermáková Z.², Plíšková L.³

¹ Klinika infekčních nemocí Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové

² Ústav klinické mikrobiologie Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové

³ Ústav klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové

Akutní toxoplazmóza je závažné onemocnění u imunokompromitovaných nemocných a u gravidních pacientek pro možnost poškození plodu. Rozsah postižení plodu je přímo závislý na době gestace a akvírování akutní infekce Toxoplasmou gondii. Riziko přenosu z matky na plod roste s pokročilostí gravidity, na druhou stranu však tíže poškození plodu klesá s dobou těhotenství.

Sérologická vyšetření matky nemusí vždy dávat jasný obraz o aktuálním stavu infekce. Pozitivní průkaz DNA Toxoplasma gondii metodou PCR vypovídá o akutnosti infekce. Ke spolehlivému průkazu DNA Toxoplasma gondii vždy záleží na typu odebraného biologického materiálu. U gravidních pacientek při pozitivních akutních sérologiích vždy vyšetřujeme: sérum matky (při prvním kontaktu), amniovou tekutinu (je-li indikovaná amniocentéza z gynekologického, infektologického nebo genetického hlediska), sérum novorozence po porodu (při suspekci či prokázané infekci plodu) a méně často též i sérum plodu (při indikované kordocentéze).

Případné positivity DNA Toxoplasma gondii z jednotlivých biologických materiálů musí být pečlivě zhodnoceny a zpravidla mají odezvu ve specifické antiprotozoální terapii. Včas rozpoznaná kongenitální toxoplazmóza byla vždy léčena s dobrým efektem.

PharmDr. Lenka Plíšková

ÚKBD, FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

tel.: +420-495 833 894
e-mail: pliskova@lfhk.cuni.cz

SeptiFast a jeho místo v diagnostice sepsí

Plíšková L.¹, Bolehovská R.¹, Hypiusová V.¹, Čermák P.²

¹ Ústav klinické biochemie a diagnostiky,

² Ústav klinické mikrobiologie, LF a FN Hradec Králové

Úvod: Sepse je významným celosvětovým problémem, na rozdíl od jiných nemocí je spojena se stále vzrůstající incidencí a v současné době stále vysokou úmrtností. Jedním z důvodů vysoké mortality sepse je obtížnost diagnostikování a následné léčby tohoto závažného stavu.

Metodika: Komerční test SeptiFast umožňuje detekci 25 nejčastějších původců sepsí G-, G+ bakterií a hub ve vzorcích krve. Patogenní DNA je izolována pomocí SeptiFast Lys Kitu a SeptiFast Prep Kitu dle pokynů výrobce. Vlastní amplifikace probíhá ve třech multiplex real-time PCR reakcích pro G+, G- bakterie a fungi. Identifikace jednotlivých původců se provádí na základě analýzy teploty tání pomocí SeptiFast Identification Softwaru.

Výsledky: V rámci pilotní studie jsme vyšetřili 81 vzorků krve od 62 pacientů, hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče ve FN Hradec Králové. 19 vzorků bylo pozitivních (byl detekován 1 až 3 původci sepse), 55 negativních a u 7 vzorků byla zjištěna přítomnost inhibitorů DNA polymerázy. Nejčastějším původcem byla *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*.

Závěr: Přínosem testu je zejména rychlost průkazu bakteriální nebo fungální DNA vybraných původců (do 8 hodin po odběru krve) a možnost detekce více původců sepse současně. SeptiFast test by se mohl stát v některých indikovaných případech (zejména u těžké sepse, mykotické infekce, polymikrobiální infekce) součástí diagnostického procesu septického stavu pacienta.

Mgr. Pavel Trubač

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

tel.: +420-387 873 031
e-mail: trubac@nemcb.cz

Využití sekvenace 16S rRNA při identifikaci bakteriálních infekcí

Trubač P., Piskunova N., Jakubcová M., Šimerová E.

Laboratoř molekulární biologie a genetiky, Nemocnice České Budějovice, a.s.

V současné době se stále zvětšuje nabídka jak komerčně dodávaných kitů, tak „in house“ metod pro DNA diagnostiku bakterií z klinických materiálů. Ne vždy je však zcela jasné, na jaký konkrétní patogen je třeba se zaměřit. PCR amplifikace bakteriální 16S rRNA a její následná sekvenace umožňuje v některých případech elegantní, přesný a poměrně rychlý způsob detekce bakterií. Tuto metodiku jsme začali používat nejdříve k identifikaci bakteriálních kmenů, kdy standardní mikrobiologická diagnostika nebyla jednoznačná. Postupem času jsme získané zkušenosti uplatnili i při vyšetřování klinických materiálů (krev, mozkomíšní mok, punkce, tkáně). Na vybraných kazuistikách demonstrujeme výhody i rizika spojená s touto metodou. Zejména u obtížně či dlouho se kultivujících bakterií se tato metoda ukázala být velice užitečným pomocníkem. Při interpretaci výsledků je však zapotřebí postupovat velice obezřetně, hlavně vzhledem k možnostem odběrových kontaminací nebo současnému výskytu různých druhů bakterií.

MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D.

Fakultní nemocnice Hradec Králové
Virologický úsek a NRL pro CMV
Ústav klinické mikrobiologie
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
tel.: +420-495 833 259
e-mail: stepanova@fnhk.cz

Přenos CMV mateřským mlékem

Štěpánová V.¹, Plíšková L.², Förstl M.¹, Bolehovská R.², Hušková J.³, Horáček J.³

¹ Ústav klinické mikrobiologie, NRL pro CMV,

² Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta,

³ Farmaceutická fakulta Karlovy Univerzity, Hradec Králové

Úvod. Mateřské mléko je důležitým zdrojem přenosu CMV v raném postnatálním období. Naše studie byla zaměřená na přenos CMV mateřským mlékem u vybraných matek na porodnicko-gynekologické klinice FN v Hradci Králové v letech 1999 – 2002.

Materiál a metody. Bylo vyšetřeno 100 vzorků mateřského mléka odebraných od matek fyziologických novorozenců 4. den po porodu a 100 vzorků od matek novorozenců s různými patologickými stavy do 30 dnů po porodu. Izolace CMV se prováděla na buněčné kultuře lidských embryonální fibroblastů po dobu 3 týdnů. Cytopatický efekt byl většinou prokazován 5. – 7. den od začátku kultivace. CMV DNA byla vyšetřována metodou PCR nested. DNA byla izolována pomocí QIAampR DNA Mini Kit, primery byly vybrány z oblasti immediate early genu (JCM 1992). Produkt PCR byl detekován ELFO na 2% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. Proužky o velikosti 242 bp (1. PCR) 146 bp (2. PCR) identifikovaly CMV DNA. Senzitivita metody byla 100 kopií/ml. Průkaz CMV IgM, IgG a avidity konfirmoval aktivní infekci, eventuelně primoinfekci.

Výsledky. CMV nebyl prokázán ani v jednom případě v mateřském mléce matek fyziologických novorozenců. Ve 29 vzorcích mateřského mléka odebraných od matek patologických novorozenců byl prokázán CMV, ve 21 případech pomocí PCR, v 6 vzorcích pomocí PCR i izolace a ze 2 vzorků pouze izolačně. Průměrný věk těchto matek byl 28 let, průměrný věk novorozenců matek s prokázaným CMV byl 26 dnů. Tato skupina novorozenců zahrnovala děti předčasně narozené, s nízkou porodní váhou nebo jinými patologickými stavy. 8 dětí mělo vážné klinické symptomy. Další vývoj dětí ale nebyl dlouhodobě sledován. U jednoho dítěte bylo později diagnostikováno postižení sluchu.

Závěr. Hlavně novorozenci s různými patologickými stavy jsou ohroženi CMV v raném postnatálním období. Použití PCR několikanásobně zvýšilo průkaz CMV z mateřského mléka, ale je celkové procento přenosu menší než je udáváno v literatuře (29%). I na tento zdroj CMV je nutné myslet zejména u patologických novorozenců.

MUDr. Petr Hubáček

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol

V úvalu 84

150 06 Praha 5 - Motol

tel.: +420-224 432 026

e-mail: petr.hubacek@lfmotol.cuni.cz

CMV infekce u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk

Hubáček P.^{1,2}, Hrdličková A.², Keslová P.¹, Formánková R.¹, Nagyová B.¹, Sedláček P.¹

¹Klinika dětské hematologie a onkologie

²Laboratoř molekulární genetiky Pediatrické kliniky, 2. LF UK a FN Motol, Praha

Infekce lidským cytomegalovirem (CMV) stále zůstává důležitou příčinou morbidit a mortality po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT). Přes pokrok v detekci a pre-emptivní strategií léčby a rozšiřujícím se terapeutickým možností, dochází u některých pacientů k rozvoji symptomatické CMV nemoci a při dlouhodobé léčbě také selekci virových mutant rezistentních k virostatikům.

Od I/2002 do VIII/2007 jsme prospektivně vyšetřili 5057 vzorků krve od 142 dětských pacientů po alogenní HSCT (medián 9,4 roku, rozmezí 0,2-20,5). Většina pacientů (78%) byla transplantována pro maligní onemocnění myeloablativním režimem. Všem pacientům byl profylakticky podáván acyklovir. Přítomnost CMV byla testována pomocí RQ-PCR v DNA izolované z plné krve. V průběhu sledování jsme CMV detekovali celkem v 998 vzorcích od 91 pacientů. U 42 (29,6%) pacientů byl CMV detekován ve vyšší kvantitě a proto u nich byla zahájena preemptivní léčba. U 23 léčených následně docházelo k opakovaným reaktivacím a léčbě i po dni 100 od HSCT. Lékem první volby byl ganciklovir (GCV), další alternativou byl foscarnet, cidofovir či valganciclovir. U 11 pacientů se objevily klinické příznaky CMV infekce, u 2 došlo k rozvoji plně symptomatické CMV nemoci (fatálně probíhající CMV pneumonie, CMV encefalitida s retinitidou). U jedné pacientky jsme pozorovali kombinaci fatální aspergilové a CMV pneumonie. U pacientů s CMV pneumonií jsme pozorovali výrazný rozdíl mezi kvantitou viru v postižené tkáni oproti periferní krvi. Pacientka s encefalitidou byla v období před objevením se příznaků nemoci téměř trvale léčena pro CMV reaktivace, a proto jsme měli klinické podezření na GCV rezistentní mutantu viru, kterou jsme následně prokázali. U jednoho pacienta s chronickou GvHD na trvalé imunosupresivní léčbě jsme pozorovali příznakovou primoinfekci více jak 5 let po HSCT a také u něj se během dlouhodobé léčby virostatiky selektovala GCV rezistentní mutantu viru.

Naše zkušenosti ukazují, že ačkoli jsme schopni časnou terapií úspěšně léčit CMV reaktivace, je třeba mít na zřeteli rizika, jimiž jsou selekce rezistentních mutant a pozdní reaktivace při trvající imunosupresi. Kvantifikace virové nálože se proto stává u významně imunosuprimovaných pacientů podmínkou, možnost rychlé detekce virů rezistentních k virostatikům pak velkou výhodou v klinickém rozhodování.

MZO 00064203, MSMT002162081 a IGA NR 9418-3

Mgr. Radka Bolehovská

ÚKBD, FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

tel.: +420-495 833 894
e-mail: bolehrad@fnhk.cz

Validace in-house PCR pro průkaz DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Bolehovská R., Plíšková L., Hypiusová V.
Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové

Úvod: Spirochety *Borrelia burgdorferi* sensu lato (BB) vyvolávají multisystémové infekční onemocnění, které je charakterizováno pestrými klinickými obrazy, obtížnou identifikací příznaků a v neposlední řadě i náročností laboratorního průkazu.

Cíl: Zavedení a následná validace metody pro průkaz DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato spolu s kontrolou inhibice reakce v jedné zkumavce.

Metoda: Primery a sondy (TaqMan) pro real-time PCR byly pro BB vybrány z oblasti chromozomálního genu kódujícího protein flagellin a pro kontrolu inhibice z oblasti HLA-DQ genu. Metoda byla prováděna na přístroji RotorGene 3000 za využití univerzálního teplotního profilu.

Výsledky: Podařilo se nám zavést metodu multiplex real-time PCR pro průkaz DNA BB a kontrolou inhibice, aniž by došlo k ovlivnění citlivosti reakce pro BB. Metoda byla následně validována s těmito výsledky: citlivost reakce pro BB byla 1 organizmus/ml (resp. 8000 kopií plazmidové DNA/ml); zjištění opakovatelnosti a reprodukovatelnosti Ct hodnot bylo provedeno na dvou vzorcích o různých hladinách s výsledkem do 5%. Specifita reakce byla ověřena pomocí BLAST.

Závěr: Metoda byla plně zvalidována a úspěšně začleněna do rutinní mikrobiologické diagnostiky borreliových infekcí.

MVDr. Zuzana Čermáková, Ph.D.

Ústav klinické mikrobiologie
FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

tel.: +420-495 833 540
e-mail: cermakovaz@lfhk.cuni.cz

Laboratorní diagnostika infekcí patogenními leptospirami člověka

Čermáková Z.¹, Voxová B.¹, Plíšková L.², Bolehovská R.², Prášil P.³, Honegr K.³

¹ Ústav klinické mikrobiologie, FN Hradec Králové

² Ústav klinické a biochemické diagnostiky, FN Hradec Králové

³ Klinika infekčních nemocí, FN Hradec Králové

Leptospirové infekce zahrnují velkou skupinu horečnatých onemocnění člověka i zvířat (typické zoonózy) a na území ČR se vyskytují obvykle s incidencí 0,3 na 100000 obyvatel. Vyšší výskyt je spojován s periodickým přemnožením hlodavců a záplavami.

V parazitologické laboratoři ÚKM FN Hradec Králové jsme zaznamenali šestinásobně vyšší výskyt laboratorně potvrzených diagnóz leptospirozy po povodních v roce 2000. Vzhledem ke zvýšené pozornosti, kterou věnujeme i suspektním nálezům získaným sérologickým vyšetřením a zavedení PCR metody do rutinní diagnostiky, pozorujeme vyšší počet pozitivních výsledků i dnes. Metoda polymerázové řetězové reakce prokazuje DNA patogenních leptospir v různých vzorcích biologického materiálu (plazma, likvor, moč, bronchoalveolární laváž apod.) již v časných fázích onemocnění. Pro přesné určení sérovaru je použita, po vytvoření dostatečné hladiny protilátek, metoda mikroaglutinace-lýza (MAL), neboť jednotlivé sérovary způsobují charakteristické klinické obrazy a jsou spojeny s konkrétními zvířecími rezervoáry (důvody epidemiologické).

Ve sdělení jsou uvedeny výsledky vyšetření metodami PCR a MAL v letech 2002 – 2005 a doporučení pro odběr vzorků biologického materiálu, neboť výsledky laboratorních metod jsou limitovány správnou klinickou indikací, dodržáním doporučených postupů a doby odběru biologického materiálu.

MUDr. Michaela Svobodová

Ústav klinické mikrobiologie FN a LF UK Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

tel.: +420-495 832 630
e-mail: svobodova@lfhk.cuni.cz

Kasuistika I.

Svobodová M.¹, Bareková L.², Štumor F.³

¹ Ústav klinické mikrobiologie FN a LF UK Hradec Králové

² Mikrobiologické oddělení, Pardubická krajská nemocnice, a.s.

³ SEDIUM s.r.o., Laboratoř molekulární biologie, Pardubice

MUDr. Miroslav Förstl

Ústav klinické mikrobiologie FN a LF UK Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

tel.: +420-495832387

e-mail: forstlm@lfhk.cuni.cz

Kasuistika II.

Förstl M.¹, Voxová B.¹, Kohout A.², Plíšková L.³

¹ Ústav klinické mikrobiologie FN a LF UK Hradec Králové

² Fingerlandův ústav patologie FN a LF UK Hradec Králové

³ Ústav klinické biochemie a diagnostiky FN a LF UK Hradec Králové

Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.

Ústav klinické mikrobiologie FN a LF UK Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

tel.: +420-495 833 132
e-mail: buchtav@lfhk.cuni.cz

Kasuistika III.

Buchta V., Mlynář J.

Ústav klinické mikrobiologie FN a LF UK Hradec Králové

Mgr. Petr Králík, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70
621 00 Brno

tel.: +420-533 331 615
e-mail: kralik@vri.cz

Atypické mykobakteriózy u lidí

Králík P.¹, Morávková M.¹, Slaná I.¹, Mrlík V.¹, Svobodová J.², V. Vašků V.³,
Dastychová E.³, I. Pavlík I.¹

¹ Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. i.

² Laboratoř pro mikrobiologii TBC a mykobakterií, Zdravotní ústav se sídlem v Brně

³ 1. dermatovenerologická klinika, FN u sv. Anny, Brno

Zdravotně významné mykobakterie, které nepatří do komplexu *Mycobacterium tuberculosis* a *M. avium*, se řadí mezi takzvané podmíněně patogenní atypické mykobakterie. Vyskytují se běžně v prostředí a riziko představují především pro imunokompromitované jedince a děti.

Na našem pracovišti jsme prováděli došetřování vzorků tkání a prostředí několika pacientů, u kterých byla prokázána mykobakteriíza. Všechny vzorky tkání a zevního prostředí byly kultivovány a izoláty, které byly mikroskopicky pozitivní na přítomnost acidorezistentních tyček, byly vyšetřeny kultivačně nezávislými metodami (PCR a sekvenování 16S rDNA a ITS oblastí). Sekvence byly srovnány s databázemi na internetu (GenBank a RIDOM) a některé mykobakteriální druhy se tímto způsobem podařilo identifikovat.

V přednášce budou prezentovány výsledky sledování několika pacientů s akutní i chronickou mykobakteriízou, v jejichž bydlech a pracovištích byly hledány zdroje mykobakteriální infekce.

Práce byla vypracována s podporou grantu Ministerstva zemědělství České republiky MZE0002716201.

Mgr. Radka Příbylová

Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70
621 00 Brno

tel.: +420-533 331 611
e-mail: pribylova@vri.cz

Studium expresních profilů u *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Příbylová R.¹, Králík P.¹, Beran V.¹, Bull T.², Pavlík I.¹

¹ Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

² Department of Cardiovascular Sciences-Surgery St. George's Hospital Medical School, London, England

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) je intracelulární obligátní patogen, který vyvolává významné onemocnění zvířat zvané Johneho choroba. Z hlediska humánní medicíny existuje silný předpoklad, že MAP je jedním z původců vyvolávajících Crohnovu chorobu u lidí. Studium genové exprese pomocí RNA představuje účinný nástroj pro odhalení molekulární podstaty fenotypu a heterogenity chorob nebo identifikaci specifických genů zapojených do procesu vzniku a průběhu chorob a následné zvolení optimální léčby. Cílem naší studie bylo zjistit expresní profily vybraných genů patogenity, adhezivity a virulence u různých kmenů MAP *in vitro* za působení určitých stresových faktorů. Vzhledem k tomu, že MAP byly dříve prokázány v mléce a mléčných výrobcích byly jako stresové faktory zvoleny různé teploty používané při pasteračním procesu a dále kyselina mléčná jakožto součást mléčných výrobků. Snížená nebo zvýšená exprese daných genů za působení určitých stresových faktorů může poukazovat na inhibiční nebo naopak stimulační efekt daného faktoru na geny pro patogenitu, adhezivitu nebo virulenci u MAP.

Práce byla vypracována s podporou grantu Ministerstva zemědělství České republiky MZE0002716201 a EU projektu PathogenCombat.

Mgr. Iva Slaná

Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70
621 00 Brno

tel.: +420-533331618
e-mail: slana@vri.cz

Infekce TBC u psa domácího – kasuistika

Slaná I.¹, Morávková M¹, Mrlík V.¹, Svobodová J.², Králík P.¹, Pavlík I.¹

¹ Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. i.

² Laboratoř pro mikrobiologii TBC a mykobakterií, Zdravotní ústav se sídlem v Brně

M. tuberculosis způsobuje infekce zejména u lidí, v naší laboratoři jsme však zaznamenali i přítomnost *M. tuberculosis* u dvou psů, kteří byli v kontaktu s pacientem s diagnostikovanou otevřenou formou plicní tuberkulózy.

U jednoho ze psů se nám podařilo metodou IS6110 PCR (PCR detekující specifickou inzerční sekvenci IS6110, která je specifická pro zástupce komplexu *M. tuberculosis*) intravitálně prokázat přítomnost zástupců *M. tuberculosis* komplexu z trusu, postmortálně z mízní uzliny podčelistní a ze střeva obou psů. V prostředí zahrady se podařilo metodou IS6110 PCR zástupce *M. tuberculosis* komplex prokázat z míčků na hraní, nedopalku cigarety a trusu. Kultivačně se zástupce *M. tuberculosis* prokázat u psů a v prostředí nepodařilo. V zevním prostředí byly izolovány různé druhy podmíněně patogenních mykobakterií.

Práce byla vypracována s podporou grantů Ministerstva zemědělství České republiky MZE0002716201 a 1B53009.

Mgr. Monika Morávková

Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70
621 00 Brno

tel.: +420-533 331 618
e-mail: moravkova@vri.cz

Infekce TBC u prasete domácího – kasuistika

Morávková M.¹, Mrlík V.¹, Slaná I.¹, Králík P.¹, Parmová I.², Havelková M.³, Pavlík I.¹

¹ Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

² Laboratoř bakteriologie, Státní veterinární ústav Praha

³ OS mykobakteriálních infekcí a NRL pro mykobakterie, Státní zdravotní ústav Praha

Přestože vakcína proti humánní TBC infekci existuje již několik desítek let, tuberkulóza zůstává celosvětově rozšířenou chorobou, která je příčinou smrti tří miliónů lidí ročně. U zvířat jsou původcem tuberkulózních změn především *Mycobacterium bovis* a zástupci komplexu *M. avium*. Ojediněle jsou však zaznamenávány infekce způsobované původcem humánní TBC *M. tuberculosis*.

Při rutinním vyšetření na jatkách v České republice byl zaznamenán výskyt kalcifikovaných tuberkulózních změn v mízních uzlinách podčelistních u dvou prasat domácích chovaných na malé hospodářské farmě. Kultivačním vyšetřením bylo zjištěno *M. tuberculosis*.

Při pátrání po zdroji infekce byla došetřena sérologicky a intradermálním testem s bovinním a aviárním tuberkulinem i ostatní zvířata nacházející se na této farmě (prase, kůň, osel, skot). Oba tyto imunologické testy byly u ostatních zvířat na přítomnost *M. tuberculosis* komplex negativní. Přesto ostatní prasata pocházející z této farmy byla utracena a přítomnost *M. tuberculosis* byla u nich potvrzena v mandlích a střevě metodou PCR. Při pátrání po zdroji infekce bylo zjištěno, že o zvířata se staral muž, pocházející z Ukrajiny, dodatečným vyšetřením byla u něj zjištěna otevřená forma plicní tuberkulózy.

Práce byla vypracována s podporou grantů Ministerstva zemědělství České republiky MZE0002716201 a 1B53009.