



ODDĚLENÍ KLINICKÉ BIOCHEMIE A DIAGNOSTIKY
PARDUBICKÁ KRAJSKÁ NEMOCNICE, a.s., Kyjevská 44, 532 03 Pardubice

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

ODBORNOU KONFERENCI

**RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI 2009**

RANK 2009

**28. a 29. leden 2009
v prostorách hotelu Zlatá štika, Pardubice**

SBORNÍK SDĚLENÍ

www.rank.cz

PROGRAM ODBORNÉ KONFERENCE

**RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI 2009
RANK 2009**

28. a 29. leden 2009

v prostorách hotelu Zlatá štika, Pardubice

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

28. ledna 2009 středa

10.00 – 12.30 Registrace

13.00 – 13.15 Zahájení

13.15 – 13.45 Úvodní sdělení

Doc. RNDr. Ladislav Pecen, CSc., Ústav Informatiky, Akademie věd ČR:
**Výhody aplikace standardních pravidel klinického výzkumu ve studiích
týkajících se diagnostických metod (30 min)**

13.45 – 15.45 Kontrola kvality molekulárně biologických postupů
koordinátoři: **Mgr. Petr Králík, Ph.D., Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.**

I. Standardizace a kontrola

PharmDr. Lenka Plíšková a kol., Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF a FN
Hradec Králové:

Možnosti kontroly a standardizace molekulárně biologických metod (25 min)

Mgr. Petr Králík, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství v.v.i., Brno:
**Validace a standardizace metod real time qPCR pro detekci a kvantifikaci
patogenů (15 min)**

RNDr. Tomáš Kuchta, CSc., Výzkumný ústav potravinářský, Bratislava:
**Problémy použitia interného štandardu pri kvantitatívnych aplikáciach PCR (15
min)**

14.45 – 15.05 Přestávka

II. Mezilaboratorní porovnávání

Mgr. Pavel Hložek a kol., GeneProof a.s., Brno:
**Aspekty využití panelů externí kontroly kvality pro validaci rutinních
laboratorních metod v molekulární mikrobiologii (15 min)**

MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D. a kol., Virologický úsek a NRL pro CMV, Ústav klinické mikrobiologie, FN a LF Hradec Králové:

Externí hodnocení kvality 2008 – Molekulárně biologická diagnostika DNA lidského cytomegaloviru (15 min)

RNDr. Kateřina Roubalová, CSc., Vidia s.r.o., Vestec:

Externí kontrola kvality průkazu DNA virů herpes simplex a varicella zoster (10 min)

15.45 – 16.00 Přestávka

16.00 – 17.00 Humánní genom

koordinátor: Ing. Petra Riedlová

Ing. Petra Riedlová a kol., P&R LAB a.s., Laboratoř molekulární biologie, Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín:

Význam farmakogenetiky pro individualizaci léčby pacientů (15 min)

Ing. Arpád Bóday a kol., P&R LAB a.s., Laboratoř molekulární biologie, Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín:

Frakvence K-ras mutací u sporadického kolorektálního karcinomu a anti-EGFR léčba – porovnávání detekčních metod (15 min)

Mgr. Michal Zemánek, Ph.D. a kol., IMALAB s.r.o., Zlín:

Současné stanovení polymorfismů genů Cyp2C9 a VKORC1: (r)evoluce v dávkování warfarinu (15 min)

17.00 – 17.15 Přestávka

17.15 – 18.30 Firemní sdělení

koordinátor: Ing. František Šturm

Roche s.r.o. (15 min)

LABOSERV s.r.o. (10 min)

LAB MARK a.s. (10 min)

DYNEX LABORATORIES, s.r.o. (10 min)

AscoMed s.r.o. (10 min)

IMMUNOTECH a.s. (10 min)

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

BAG Health Care GmbH (10 min)

GeneProof a.s. (10 min)

Vidia s.r.o. (10 min)

19.30 – 23.00 společenský večer v hotelu Zlatá štika

29. ledna 2009 čtvrtek

8.30 – 9.45 Detekce borrelií

koordinátor: MUDr. Zuzana Medková, Ph.D.

MUDr. Zuzana Medková, Ph.D., IFCOR 99 s.r.o., Brno:

Diagnostika Lymeské nemoci (LD) metodou PCR – ano či ne, kdy a jak ???
(15 min)

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

Možnosti a úskalí detekce DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato (15 min)

MUDr. Hana Roháčová, Ph.D., Infekční klinika, FN Na Bulovce, Praha:

Klinické formy lymeské borreliózy (15 min)

RNDr. Dagmar Hulínská, CSc. Ph.D., SZÚ, NRL pro borreliózu, Praha:

Detekce a kvantifikace *Borrelia* sp. a dalších bakterií z klíšťat pomocí LightCycler PCR v reálném čase (15 min)

9.45 – 10.00 Přestávka

10.00 – 11.00 Toxoplazmóza a imunodeficientní stavy

koordinátor: MUDr. Miroslav Förstl

MUDr. Zuzana Rusiňáková a kol., Hemato-onkologická klinika, FN Olomouc:

Toxoplazmová infekcia u imunosuprimovaných pacientov – praktické skúsenosti (15 min)

PharmDr. Barbora Voxová, Ústav klinické mikrobiologie, FN a LF Hradec Králové:
Úskalí laboratorní diagnostiky mozkové toxoplazmózy (15 min)

MUDr. Zbyněk Valenta, Centrum biologické ochrany Těchonín:

Toxoplazmová encefalitida u pacienta s HIV infekcí (15 min)

11.00 – 11.15 Přestávka

11.15 – 12.30 Varia

koordinátor: Ing. František Šturm

Mgr. Iva Sakmaryová a kol., VIDIA – Diagnostika s.r.o., Praha:

Sekvenční analýza GBV-C/HGV u HIV pozitivních pacientů (15 min)

MUDr. František Musil a kol., BioLab s.r.o., Klatovy:

První zkušenosti s průkazem HPV metodou reverzní hybridizace (15 min)

Ing. Barbara Brežná, Ph.D., Výzkumný ústav potravinářský, Bratislava:

Důkaz para orechov v potravinách pomocou real-time PCR (15 min)

12.30 – 13.00 Diskuse, závěr

Doc. RNDr. Ladislav Pecen, CSc.

Ústav Informatiky AV ČR
Pod vodárenskou věží 2
182 07 Praha 8

tel.: 603 790 990
e-mail: Ladislav.Pecen@seznam.cz

Výhody aplikace standardních pravidel klinického výzkumu ve studiích týkajících se diagnostických metod

Ladislav Pecen
Ústav Informatiky, Akademie věd ČR

Ukazuje se, že aplikace přísných pravidel z klinického výzkumu snižuje variabilitu výsledků různých studií. I při vyhodnocení diagnostických souprav by bylo vhodné provést předem následující důležité kroky:

- 1) Definovat primární cíl studie a její sekundární cíle. Jen výsledky týkající se primárního cíle (či cílů) jsou konfirmační. Všechny výsledky ohledně sekundárních cílů jsou explorační, tj. měly by být potvrzeny ještě další konfirmační studií, chceme-li výsledek prezentovat jako konfirmační. Pokud je více primárních cílů, musí se mezi ně dělit celková hladina významnosti (musí se adjustovat na mnohonásobné porovnávání).
- 2) Je třeba formálně formulovat nulovou hypotézu vs. alternativní hypotézu. Tedy též vybrat, jedná-li se o oboustranný či jednostranný test, jde-li o testování superiority, non-inferiority, ekvivalence s předem definovanou oblastí ekvivalence apod.
- 3) Dle vybraného primárního cíle určit potřebný rozsah výběru (dle použitého testu, hladiny významnosti, síly testu a hlavně dle difference, kterou považujeme za klinicky významnou).
- 4) Specifikovat jak pracovat s chybějícími či neúplnými pozorováními (např. ne vždy jsou všechny laboratorní parametry měřeny).
- 5) Jak řešit případy, kdy nebyla splněna kritéria studie (jak vstupní, tak kritéria průběhu studie). S tím souvisí volba populace (podskupiny pacientů), na které se bude provádět konfirmační testování.
- 6) Rozhodnutí, budou-li data analyzována v průběhu studie, či až po ukončení sběru dat. Budou-li data analyzována průběžně, je nutné adjustovat na tento fakt statistické testování a definovat kritéria předčasného ukončení studie.

Statistika tedy musí být i na začátku každého výzkumu, kde jsou na konci výzkumu pak použity statistické metody. Na začátku výzkumu je vždy nějaká otázka/hypotéza a ta se týká nějaké populace. Studie má být otevřením, byť pravděpodobnostním, dveří k pravdě, a proto tolik statistických rozhodnutí je nutných předem. Studie by neměla mít náhodně zvolený rozsah výběru, protože pak, i když difference existuje a je taková, že ji klinik označuje za klinicky relevantní (ve smyslu průměrné a nikoliv individuální difference), studie jí stejně pravděpodobně neprokážeme jako statisticky významnou. Takovou studii, kde je méně pacientů než je žádoucí, označujeme za underpowered. Příliš velký rozsah výběru je mrháním času i peněz a pak to vede k tomu, že pokud existuje v populaci byť nepatrný rozdíl, pak tento rozdíl s rostoucím

rozsahem výběru prokážeme jako statisticky významný. Studie, kde je mnohem více pacientů než je spočítaný potřebný rozsah výběru se označuje jako overpowered. Dodržování kroků výše sníží variabilitu výsledků mezi různými studiemi. Problém je i v tom, že statisticky nevýznamné výsledky nebývají obvykle publikovány. Dá se říci, že při dodržování kroků výše a publikování všech výsledků včetně těch negativních by rozdíl mezi různými studiemi byly mnohem menší.

PharmDr. Lenka Plíšková

ÚKBD FN a LF Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

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

Možnosti kontroly a standardizace molekulárně biologických metod

Plíšková L., Bolehovská R., Friedecký B.
Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové

Biochemie má již desítky let vypracovaný systém kontroly kvality v klinické laboratoři, procesy standardizace a návaznosti měření, které jsou neustále zlepšovány. V molekulární biologii však procesy standardizace a návaznosti často zaostávají za možnostmi a potřebami moderních vyšetřovacích postupů. Snahou každé laboratoře by proto mělo být zlepšení kvality pomocí validace a ověřování analytických znaků a výkonnosti metod. V molekulární biologii ale bohužel neexistují referenční metody a referenční materiály, proto není možné zjišťovat návaznost metod.

Zásadním pomocníkem v procesu standardizace molekulárně biologických metod je externí kontrola kvality (EHK), která poskytuje laboratořím možnost porovnání svých výsledků v národním nebo mezinárodním měřítku, zjištění nebo ověření citlivosti metody a v neposlední řadě může laboratoř využít vzorky EHK pro zjištění opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti dané PCR metody. EHK je v rámci extrahumánního genomu zajišťována zejména QCMD, Instand e.V., event. různými NRL.

Navíc by si každá laboratoř měla vytvořit vlastní procesy vnitřní kontroly kvality, zajištěné pomocí pozitivní a negativní kontroly v každém běhu PCR a kontroly přítomnosti inhibitorů DNA polymerázy v jednotlivých vzorcích. V případě real-time PCR je velice výhodné použití pozitivní směsné kontroly, u které je možné dlouhodoběji sledovat standardnost výsledků prostřednictvím Ct hodnot nebo absolutních kvantit. V případě PCR s elektroforetickou detekcí je výhodné navíc použít pozitivní kontrolu na hranici detekce, která umožní kontrolovat stejnou citlivost metody mezi jednotlivými reakcemi.

Při detekci virů a oportunních mikroorganismů je velmi důležitá kvantifikace výsledků a jejich klinická interpretace, určení klinických cut-off hodnot.

Všechny molekulárně biologické metody by měly být v laboratoři v případě kitových metod verifikovány a u in-house metod validovány (viz doporučení ČSKB z r. 2006 – „Validace a verifikace molekulárně biologických metod založených na analýze extrahumánního genomu“).

Mgr. Petr Králík, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70
621 00 Brno

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

Validace a standardizace metod real time qPCR pro detekci a kvantifikaci patogenů

P. Králík
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

V dnešní době neexistuje jednotný postup pro validaci a standardizaci real time qPCR metod, který je nezbytný, pokud má být daná metoda použita v rutinní klinické diagnostice či v akreditovaném režimu. Při validaci a standardizaci nové real time qPCR metody je nutné stanovit její základní parametry, kam patří především specifita, detekční limit, správnost, přesnost a opakovatelnost dané metody. Pro kvantitativní stanovení je rovněž nezbytné stanovit limit kvantifikace. Na stanovení těchto veličin existují rozdílné postupy, které se řídí současnými normami a definicemi. Jejich praktická použitelnost ve validaci a standardizaci real time qPCR je však různá.

Dalším kritériem pro validaci real time qPCR je optimalizace a standardizace izolace DNA. Tento krok je v současné době dost opomíjen, ačkoli hraje v celém procesu stanovení patogena klíčovou roli. Na základě našich zkušeností jsme navrhli systém stanovení výtěžku izolace DNA z určité matrice přímo pomocí real time qPCR na uměle kontaminované matrici. Tento krok umožňuje pozdější velice přesné určení limitu detekce a především kvantifikace. Dalším kritériem je systém pozitivních a negativních a interních amplifikačních kontrol, který monitoruje celý proces izolace DNA a real time qPCR ve všech klíčových krocích, a který by měl poskytnout informace o korektním průběhu celého vyšetření.

Práce byla vypracována s podporou grantu Ministerstva zemědělství České republiky MZE0002716201 a EU projektu 007081 PathogenCombat.

RNDr. Tomáš Kuchta, CSc.

Výskumný ústav potravinársky
Priemyselná 4
824 75 Bratislava

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

Problémy použitia interného štandardu pri kvantitatívnych aplikáciach PCR

Tomáš Kuchta
Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, Slovensko

Polymerázová reťazová reakcia s priebežnou fluorometriou (real-time PCR) umožňuje kvantifikáciu špecifického úseku DNA. Skutočnú kvantifikáciu v reálnych vzorkách však ohrozuje nízka resp. nízko reprodukovateľná výťažnosť amplifikovateľnej DNA. Analogicky ako v prípade chemickej analýzy je možné riešiť tento problém použitím endogénneho alebo exogénneho interného štandardu, ktorý sa stanovuje v režime duplex. Vzhľadom na možné reálne alebo zdanlivé kolísanie koncentrácie endogénneho interného štandardu je jeho použitie v princípe vhodné iba na účely relatívnej kvantifikácie. Ako exogénny štandard pre absolútnu kvantifikáciu je možné využiť fragment DNA s vhodným markérom, ale v tomto usporiadaní sme pozorovali odlišnú extrahovateľnosť pridanej DNA z roztoku a DNA z matrice. Inou možnosťou je použitie materiálu obsahujúceho DNA s vhodným markérom.

Mgr. Pavel Hložek

GeneProof a.s.
Viniční 235
615 00 Brno

tel. : +420-604 618 832
e-mail: hlozek@geneproof.cz

Aspekty využití panelů externí kontroly kvality pro validaci rutinních laboratorních metod v molekulární mikrobiologii

P. Hložek¹, J. Bednář²

¹GeneProof a.s.

²FSI, VUT v Brně

V posledních letech dochází k výraznému nárůstu použití technik molekulární biologie k detekci klinicky významných mikrobiálních a virových onemocnění. Molekulárně biologické detekce založené na kvantitativním PCR v reálném čase se staly, zvláště při stanovení některých patogenů, zlatým standardem v mikrobiologických laboratořích na celém světě.

Velký rozvoj těchto technik na jedné straně a nutnost standardizace a akreditace všech používaných vyšetření v rutinních laboratořích na straně druhé vede k nutnosti přesně validovat technické parametry zavedených PCR metod (sensitivita detekce, specificita detekce, přesnost kvantifikace patogena včetně validace variability kvantitativního stanovení a mnoho dalších parametrů...) a takto validované parametry ověřit pomocí nezávislých panelů externí kontroly kvality (Instand, QCMD, EHK...).

V naší laboratoři jsme vyvinuli a validovali soubor metodických postupů (a jejich konkrétních variant pro konkrétní patogen) sledujících celý proces zpracování klinického materiálu od jeho odběru až po odečtení výsledků. Pro ověření našich postupů jsme použili (a používáme) panely kontroly kvality (Instand, QCMD), pomocí kterých jsme potvrdili správnost námi dosažených výsledků.

Práce byla prováděna za podpory dotačních programů:

MPO ČR č. FT-TA3/098

MPO ČR č. FI-IM5/042

MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D.

NRL pro cytomegaloviry
ÚKM a ÚKBD FN a LF UK Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

tel.: +420-495 833 259
e-mail: stepanova@fnhk.cz

Externí hodnocení kvality 2008 – Molekulárně biologická diagnostika DNA lidského cytomegaloviru

Štěpánová V., Plíšková L., Bolehovská R.
NRL pro cytomegaloviry, ÚKM a ÚKBD, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové

Diagnostika infekce lidským cytomegalovirem (CMV) a možnost monitorování odpovědi na terapii má velký význam zejména u imunokompromitovaných pacientů. Rozvoj a rychlé zavádění polymerázové řetězové reakce (PCR) do laboratorní diagnostiky v České republice musí mít odezvu v programu externí kontroly kvality (EHK), průkazu CMV DNA metodou PCR. Tento program by měl přinést informace týkající se metodiky průkazu CMV DNA a zároveň by měl sloužit k porovnání výsledků v jednotlivých laboratořích i mezi jednotlivými laboratořemi.

Po zkušebním panelu 8 vzorků v roce 2006, kterého se zúčastnilo 8 laboratoří, byl první ročník zahájen v roce 2007 s 20 účastníky. Výsledky vyšetření 6 vzorků (5 CMV DNA pozitivních a 1 negativní, kvantita od 10^5 do 10^2 kopií/ml) byly v průměru velmi dobré, nevyhovující výsledky dodala pouze 1 laboratoř se správnou identifikací pouze u vzorku s nejvyšší kvantitou CMV DNA.

V dubnu 2008 se EHK CMV DNA zúčastnilo 25 laboratoří, které odeslaly 26 výsledkových listů s kvalitativními výsledky a 21 výsledkových listů s kvantitativními výsledky. Bylo testováno 6 kontrolních vzorků (5 CMV DNA pozitivních obsahujících kmen CMV AD169 s kvantitou od 10^7 do 10^3 kopií/ml a 1 vzorek negativní). Kvalitativní a kvantitativní výsledky v kódovaných protokolech byly hodnoceny samostatně. Nejvyššího počtu bodů dosáhlo 23 laboratoří (tj. 88,5 %) a jejich hodnocení kvalitativních výsledků bylo výborné. Ztrátu tří bodů měly dvě laboratoře (7,7 %) s kvalitativním hodnocením dobré, 1 laboratoř (3,8 %) získala 12 bodů a její hodnocení bylo špatné (2 falešně negativní výsledky). Všechny kvantitativní výsledky byly převedeny do dekadického logaritmu, spočítán jejich průměr a směrodatná odchylka a vytvořeny intervaly správnosti. Výsledky, které jsou v rozmezí intervalu $\pm 1SD$ a $\pm 2SD$, jsou hodnoceny jako správné. Z celkového počtu 21 výsledkových listů mělo všechny kvantitativní výsledky v rozmezí $\pm 1SD$ 9 laboratoří. Informace o používané metodice poskytlo 24 laboratoří.

Tento běh EHK pro průkaz CMV DNA potvrdil zájem laboratoří České republiky o účast v programu kontroly kvality i dobrou úroveň této diagnostiky ve většině zúčastněných laboratoří.

RNDr. Kateřina Roubalová, CSc.

Vidia s.r.o.
Nad Safinou II/365
252 42 Vestec, pošta Jesenice u Prahy

tel.: +420-261 090 572
e-mail: kroubalova@vidia.cz

Externí kontrola kvality průkazu DNA virů herpes simplex a varicella zoster

RNDr. K. Roubalová, Vidia s.r.o.

V roce 2007 organizovala Národní referenční laboratoř pro herpetické viry, SZÚ, Praha zkušební kolo EHK průkazu DNA virů HSV a VZV. 14ti zúčastněným laboratořím bylo zasláno 7 vzorků (2 VZV-pozitivní, 2 HSV1- pozitivní, 2 HSV2-pozitivní a jeden negativní).

DNA HSV vyšetřovalo všech 14 laboratořích a všechny výsledky byly kvalitativně správné. Většina laboratořích (86%) používá komerční diagnostické kity a provádí real-time PCR (79%).

Kvantitativní výsledek dodalo 43% laboratořích. VZV vyšetřilo 11 ze zúčastněných laboratořích, 82% z nich se zcela správným výsledkem, 2 laboratoře nezachytily pozitivitu u vzorku s hraniční koncentrací DNA (řádově 100 kopií/ml). Komerční soupravy pro detekci DNA VZV použilo 72% laboratořích. Kvantitativní výsledky dodaly 3 laboratoře. Výsledky zkušebního kola budou porovnány s výsledky série EHK z roku 2008.

Ing. Petra Riedlová

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

tel.: +420-556 794 233

e-mail: petra.riedlova@onkologickecentrum.cz

Význam farmakogenetiky pro individualizaci léčby pacientů

P. Riedlová, Á. Bóday

Laboratoř molekulární biologie, P&R LAB a.s., Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín

Vzájemný vztah mezi genetickou predispozicí jedince a variabilní odpovědí na podávané léky je hlavním předmětem zájmu odborníků z oblasti farmakogenetiky. Vysoce efektivní a bezpečné léčivo pro všechny pacienty neexistuje. Důvodem je genetická variabilita metabolismu, daná přítomností polymorfismů v příslušných genech v kombinaci s epigenetickými faktory. Schopnost organismu odbourávat léčiva je variabilní, a proto existují výrazné rozdíly ve velikosti léčebné dávky potřebné k dosažení požadovaného terapeutického účinku.

Nejzávažnějším problémem je možné riziko toxických a ojediněle až život ohrožujících reakcí u pacientů s defektním cílovým genem. Naopak příčinou selhání léčby může být přítomnost polymorfismů, zvyšujících aktivitu enzymů natolik, že standardní dávky léčiva neumožní požadovaný efekt. Individuální predikce terapeutické odpovědi a zároveň potenciálních projevů toxicity umožňuje navrhnout pro každého pacienta vhodnou medikaci, kdy je přihlédnuto nejen k projevům a průběhu onemocnění, ale také ke specifické genetické výbavě pacienta. V ideálním případě by farmakogenetické vyšetření mělo být provedeno před zahájením léčby, a již první dávky by tak mohly být nastaveny dle genetických predispozic pacienta.

Podle našich zkušeností je v současnosti nejžádanějším farmakogenetickým vyšetřením genotypizace genu *TPMT* před nasazením léčby na bázi thiopurinů a genů *CYP2C9* a *VKORC1* před zahájením léčby antikoagulačním léčivem warfarinem, a dále u onkologických pacientů mutace promotoru genu *UGT1A1* v případě léčby irinotecanem a nejnověji dle doporučení onkologických společností mutace v K-ras onkogenu v tumoru pacientů, indikovaných k léčbě preparáty anti-EGFR.

Ing. Arpád Bóday

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

tel.: +420-556 794 235
e-mail: arpad.boday@onkologickecentrum.cz

Frekvence K-ras mutací u sporadického kolorektálního karcinomu a anti-EGFR léčba - porovnávání detekčních metod

Á. Bóday¹, P. Riedlová¹, K. Horká¹, S. Tavandzis¹, R. Sítková¹, I. Kasperčík², M. Škrovina³, B. Donocíková⁴, J. Gruna⁴

1) Laboratoř molekulární biologie, P&R Lab a.s., Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín

2) Bioptická laboratoř, P&R LAB a.s., Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín

3) Chirurgické oddělení, NsP, Nový Jičín

4) Onkologická ambulance, P&R LAB a.s., Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín

Kolorektální karcinom (CRC) je v České republice jedním z nejčastějších nádorových onemocnění. Frekvence CRC v ČR se pohybuje okolo 75 případů na 100 000 obyvatel a mortalita 55/100 000. U mužů je pozorován vyšší výskyt než u žen. V celoevropském měřítku je Česká republika ve výskytu této diagnózy u mužů na prvním a u žen na druhém místě.

Kolorektální karcinom je výsledkem akumulace rozdílných genetických a epigenetických změn, které se objevují na úrovni chromozomů a DNA a následně potom na expresi daných genů. Tento vícekrokový proces je charakterizován inaktivací tumorsupresorů, aktivací protoonkogenů prostřednictvím mutací a/nebo ztrátou alel nebo deficiencí „mismatch repair“ genů.

V této práci byly vyhledávány mutace v onkogenu K-ras. Celkem bylo analyzováno 297 sporadických případů CRC metodami: PCR/SSCP/sekvenování, PCR/přímé sekvenování, enriched-PCR/SSCP/sekvenování, PCR/dHPLC a qPCR.

K-ras mutace byly odhaleny v 95 případech (32%). Mutace v kodonu 12 se vyskytují s nejvyšší frekvencí a byly nalezeny v 76 případech (26%). U patnácti pacientů (5%) byly detekovány mutace v kodonu 13. Mutace v kodonu 61 byly nalezeny ve třech nádorech (1%) a v jednom případě (0,3%) byla odhalena substituce AAA-ATA v kodonu 5.

Při porovnávání metod byl nejvyšší záchyt zaznamenán u enriched-PCR/SSCP/sekvenování a qPCR.

Molekulárně genetické vyšetření mutací v K-ras má limitující význam při aplikaci anti-EGFR preparátů. K-ras je součástí RAS-RAF-MEK-ERK signální dráhy, která zajišťuje přenos signálu z receptoru na povrchu buňky do buněčného jádra. Při anti-EGFR léčbě je receptor blokován a je tak zamezen vstup signálu do buňky. Bylo zjištěno, že v přítomnosti mutací v K-ras onkogenu je buněčný cyklus aktivní, a tak anti-EGFR léčba neúčinná. Zbytečně pak zatěžuje organismus a bez efektu zvyšuje náklady na léčbu. Z výše uvedených důvodů bylo vydáno nařízení onkologickými

společnostmi provádět analýzu mutací v K-ras onkogenu v tumoru u pacientů, indikovaných na anti-EGFR léčbu.

V souvislosti s anti-EGFR léčbou chceme upozornit na biologickou limitaci molekulárně genetických analýz (heterogenita nádorů) a na hranici technických možností (histologický materiál) během vyšetřovacího procesu a při hodnocení výsledků.

Tato práce vznikla s laskavou podporou firem MERCK a LABMARK.

Mgr. Michal Zemánek, Ph.D.

IMALAB s.r.o.
Laboratoř molekulární biologie
Padělký I. 4/3644
760 01 Zlín

tel. : +420-577 001 100, 602 592 024
e-mail: zemanek@imalab.cz

Současné stanovení polymorfismů genů Cyp2C9 a VKORC1: (r)evoluce v dávkování warfarinu

Michal Zemánek, Jitka Trtková
IMALAB s.r.o, Zlín, Laboratoř molekulární biologie

Warfarin (4-OH-kumarin) je nejčastěji užívané perorálně účinné antikoagulans v ČR. Warfarin (kumarinová antikoagulancia obecně) působí jako antagonist vitamínu K, který je nezbytný pro syntézu funkčních koagulačních faktorů II, VII, IX a X v játrech. Jeho nevýhodou je velmi úzké terapeutické rozmezí a široká interindividuální variabilita v reakci na určité dávkování. Nesprávné dávkování může způsobit život ohrožující komplikace, jako je krvácení v případě předávkování nebo nedostatečná profylaxe kvůli nedostatečné dávce. Dávkování warfarinu je podmíněno řadou faktorů: rasa, hmotnost, věk, příjem vitamínu K potravou, jiné užívání léků ad. V posledních letech se k těmto faktorům přidalo genetické hledisko - stanovení polymorfismu především genů *CYP450 2C9* a *VKORC1*.

Polymorfismus *CYP450 2C9* ovlivňuje rychlost biotransformace kumarinů. Podstatný význam pro biotransformaci S-warfarinu mají varianty *CYP2C9**2, *3, které snižují u svých nositelů potřebnou dávku warfarinu.

Gen *VKORC1* kóduje podjednotku 1 transmembránového proteinu - vitamin K epoxid reduktázového komplexu (cílový enzym warfarinu). Genetické varianty *VKORC1* zvyšují citlivost jedinců na warfarin (časté polymorfismy 1173 C>T a -1639 G>A), jiné naopak mohou být příčinou rezistence na warfarin (vzácné mutace).

Efekt polymorfismů *CYP450 2C9* a *VKORC1* na velikost denní dávky warfarinu potřebné k udržení terapeutického rozmezí se navzájem potencuje. Nezanedbatelná část populace patří k vysoce rizikové skupině nosičů polymorfismu *VKORC1* a současně alespoň jednoho polymorfismu *CYP450 2C9*. Tito pacienti jsou ve vysokém riziku předávkování warfarinem, zejména v úvodu léčby.

Klinický význam stanovení těchto polymorfismů je potenciálně velký. Vytipování jedinců citlivých na warfarin by mělo předejít riziku předávkování a zkrátit dobu nutnou ke stabilní warfarinizaci. Celkově by pak mělo dojít ke zvýšení bezpečnosti warfarinové terapie.

prim. MUDr. Zuzana Medková, Ph.D.

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

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

Diagnostika Lymeské nemoci (LD) metodou PCR - ano či ne , kdy a jak ???

prim. MUDr. Zuzana Medková, Ph.D.
klinické laboratoře IFCOR-99, s.r.o., Brno

Abstrakta: implantace PCR technologie do oblasti laboratorní diagnostiky borrelií byla přijímána kontroverzně již od prvopočátku zavádění a ověřování tohoto postupu do výzkumných, a poté terénních laboratoří. Lze říci, že tento stav trvá dodnes a příčin je celá řada:

- významná diskrepance mezi výsledky vysoce senzitivních, ale již mnohdy méně **klinicky** specifických sérologických nálezů zejména u tzv. chronických pacientů (např. IgM podle některých studií přetrvávají až 15 let u klinicky zcela zdravých jedinců!)
- většinová negativita vzorků odebraných pro PCR (chroničtí pacienti, nespecifikovatelná bakteriémie, nejistá optimální doba odběru, diskutovaný nejužitečnější klinický materiál atd.)

To vše přivedlo celou řadu českých mikrobiologů i klinických lékařů ke skepsi vůči této diagnostické metodě. V mém krátkém do problematiky LD jsou prezentována současná mezinárodní doporučení optimálních relací pro aplikaci PCR u pacientů s LD a v krátkosti uvádím zkušenosti pracoviště IFCOR-99, s.r.o. a FN Na Bulovce na tomto poli u souboru dospělých a dětí do 18 let věku (srovnání sérologických nálezů metodami ELISA a WB a detekce pomocí PCR).

Mgr. Radka Bolehovská

ÚKBD, FN a LF Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

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

Možnosti a úskalí detekce DNA *Borrelia burgdorferi sensu lato*

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

Diagnostika lymfické boreliózy je velice obtížná vzhledem k variabilitě klinických projevů, příznaků vyvolaných různými orgánovými postiženími, které mohou být ne zcela přesvědčivé. V neposlední řadě hraje také roli nejednoznačnost laboratorních nálezů.

Výhodou molekulárně biologických metod (zejména PCR) je významné zrychlení diagnostiky, specifita detekce DNA borélií, možnost vyšetření borélií v jakémkoliv materiálu a v případě některých PCR i vysoká citlivost. Pomocí molekulárně biologických metod je možné jednoznačně určit druh borélií, který je důležitý pro sledování epidemiologické situace a určení případného vztahu mezi jednotlivými druhy a klinickými projevy.

Detekce DNA borélií má však řadu úskalí a problémů. Prvním z nich je preanalytická fáze vyšetření (správně provedený odběr, výběr materiálu vzhledem ke klinickým projevům, podmínky transportu materiálu, skladování). Vzhledem k neobvyklému genomu borélií je záchyt DNA borélií ovlivněn také výběrem primerů - detekce genomové nebo plazmidové DNA (nejčastěji *OspC*, *OspA*). Velmi problematická je detekce DNA borélií u chronických forem onemocnění, neboť genomová DNA bývá přítomna jen ve stopových množstvích a DNA genu *OspA* většinou chybí. Detekce DNA borélií se v poslední době využívá i v rámci diferenciální diagnostiky např. u roztroušené sklerózy, neboreliové encefalitidy apod.

Možnost zlepšit záchyt DNA borélií spočívá ve vhodně načasovaném odběru biologického materiálu, správné preanalytické fázi a v kombinaci různých PCR, např. jedné specifické pro genomovou DNA a druhé pro *OspC* nebo *OspA*. Přesto bude vždy nutná korelace laboratorních nálezů s klinickým obrazem a zejména větší spolupráce klinika s laboratoří.

MUDr. Hana Roháčová, Ph.D.

Infekční klinika FN Na Bulovce
Budínova 2
180 81 Praha 8

tel.: +420-266 082 625, 605 221 092
e-mail: hana.rohacova@fnb.cz

Klinické formy lymeské borreliózy

MUDr. Hana Roháčová, Ph.D.

Klinika infekčních parazitárních a tropických nemocí FN Na Bulovce, Praha

Lymeská borrelióza (LB) je onemocnění, jehož incidence patří mezi infekčními nemocemi k jedné z nevyšších na území ČR. Klinické formy jsou velmi pestré a řada z nich může napodobovat onemocnění z oblasti revmatologické, neurologické a řady dalších. Naopak některé choroby neinfekčního původu bývají mylně diagnostikovány jako LB, a to tehdy, je-li pozitivní protilátková odpověď na LB. Ve sdělení jsou probrána jednotlivá stádia LB a klinické formy, které je provázejí. Pozornost je věnována též diferenciální diagnostice onemocnění, a to především forem kožních, neurologických a muskuloskeletálních. V závěru jsou prezentovány dvě kasuistiky. V první jde o nemocného dětského věku s pozitivním nálezem PCR a negativní protilátkovou odpovědí při neuroborrelióze. Druhý případ se týká těžkého průběhu leukoencefalitidy u mladé ženy rovněž s negativní protilátkovou odpovědí a pozitivním záchytem PCR z krve i mozkomíšního moku.

RNDr. Dagmar Hulínská, Ph.D., CSc.

SZÚ, NRL pro borreliózu, WHO Centre
100 42 Praha

tel.: +420-267 082 594
e-mail: dhulin@szu.cz

Detekce a kvantifikace *Borrelia* sp. a dalších bakterií z klišťat pomocí LightCycler PCR v reálném čase

D. Hulínská
NRL pro borreliózu, Státní zdravotní ústav, Praha

RT-PCR monitoruje PCR produkt v reálném čase a prostoru v procesu ultra-rychlého cyklování (20°C/s) za 20-30s při identických podmínkách pro 32 vzorků. Senzitivity je dosaženo výběrem vlnové délky a fluoroforů (3 kanály, optické jednotky pro vícebarevnou detekci v 530, 640 a 720 nm). Absolutní kvantifikace při užití TaqMan, rekombinantních prob apod. Množství PCR produktu roste logaritmicky v prvních 10 cyklech a senzitivita, tj. intenzita signálu produkovaného fluorofory, je úměrná množství produktu. *Borrelia* fragmenty OspA plasmidu nebo recA genu jsou detekovány v kulturách od 10 do 10⁸ kopií v jednom procesu, ale závisí na výběru primerů (CG), optimalizaci PCR a množství DNA v pg - fg (femtogram). Hybridizací se sondou OspA jsme identifikovali 3 druhy Bb z kůže pacientů a TaqMan sondou pro flagelin i z krve a moku. Měření teploty tání (melting *T_m*) diferencuje specifické produkty *Anaplasma* sp. od Bb v multiplex RT-PCR, protože každý dsDNA produkt má specifickou *T_m* a snadno se diferencuje od nespecifických dimerů. Ověření OmpA, B a gltA genů a restrikce 16S rRNA definuje přítomnost *B. henselae* v klišťeti a v biopsii srdce. Detekce agens *Rickettsiales* je více senzitivní než Bb z klinického materiálu (tkání) vzhledem k většímu množství těchto gram-negativních bakterií v buňkách obranné reakce, jejichž genom se na rozdíl od Bb během infekce a persistence nemění.

MUDr. Zuzana Rusiňáková

Hemato-onkologická klinika FN Olomouc
I. P. Pavlova 6
779 00 Olomouc

tel. : +420-588 444 221
e-mail: Zuzana.Rusinakova@fnol.cz

Toxoplazmová infekcia u imunosuprimovaných pacientov - praktické skúsenosti

¹Rusiňáková Z., ¹Raida L., ¹Faber E., ²Tomková J., ²Bednaříková J., ¹Indrák K., ²Novotný D.

¹Hemato-onkologická klinika FNOL, ²Oddelenie klinickej biochémie FNOL

Toxoplazmóza je parazitárne ochorenie, ktorého pôvodcom je *Toxoplasma gondii*. Je to obligatórny intracelulárny parazit spôsobujúci klinickú i latentnú infekciu takmer u všetkých cicavcov. Incidencia ochorenia výrazne geograficky osciluje v závislosti na lokálnych zvyklostiach starostlivosti o domáce zvieratá. U imunokompetentných jedinov zväčša spôsobuje asymptomatickú infekciu, horúčku a lymfadenomegáliu. U imunosuprimovaných pacientov môže dôjsť k rozvoju život ohrozujúcich stavov, najčastejšie pod obrazom neuroinfekcie, ale aj pľúcnej, príp. diseminovanej formy. Výskyt ochorenia je spojený s vysokou mortalitou (60 % - *R. Martino, CID, 2005*). Rizikovní sú hlavne pacienti po alogénnych transplantáciách krvotvorných buniek, ale i pacienti na dlhodobej imunosupresívnej liečbe a s prolongovanou lymfopéniou (nízke hodnoty CD4+ buniek).

Diagnostika ochorenia je problematická. Serológia je nevyťažná u pacientov s poruchou tvorby protilátok. PCR metodika má vysokú špecificitu, ale nižšiu senzitivitu. Je nutný opakovaný odber materialu (uvoľnenie tachyzoidov). Negativita PCR nevylučuje infekciu. Diagnóza je zväčša stanovená na základe kombinácie klinického stavu, PCR pozitivity, CT nálezu, zriedkavo je možný priamy dôkaz.

V prípade diagnostikovanej infekcie neexistuje jednotný štandardný postup liečby. Profylaktické podanie Biseptolu® znižuje riziko rozvoja infekcie. Význam preemtívnej liečby pri PCR pozitivite zostáva nejednoznačný. V liečbe manifestovaného ochorenia dominuje Daraprim® v kombinácii s Dalacinom®. Dĺžka supresívnej (udržiavacej) liečby nie je stanovená, vždy minimálne po dobu trvania lymfopénie v kombinácii s Biseptolom®.

Na našej klinike sme v spolupráci s Oddelením klinickej biochémie diagnostikovali 5 prípadov infekcie toxoplazmózou. 3 pacienti boli po alogénnej transplantácii periférnych kmeňových buniek, 1 po autológnej transplantácii a jedna pacientka po chemoterapii pre Hodgkinovu chorobu. Na týchto kazuistikách si v prednáške bližšie ukážeme problémy so stanovením diagnózy, ale aj liečbou u imunosuprimovaných pacientov.

PharmDr. Barbora Voxová

Ústav klinické mikrobiologie
Fakultní nemocnice Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

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

Úskalí laboratorní diagnostiky mozkové toxoplazmózy

B. Voxová¹, Z. Čermáková¹, M. Förstl¹, L. Plíšková², R. Bolehovská², P. Prášil³,
S. Plíšek³

¹ Ústav klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice, Hradec Králové

² Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, Hradec Králové

³ Klinika infekčních nemocí, Fakultní nemocnice, Hradec Králové

Abstrakt:

V České republice je toxoplazmóza nejrozšířenějším parazitárním onemocněním.

Dle výsledků sérologických studií přišlo do kontaktu s prvokem 25 - 50 % naší populace. Závažná forma onemocnění se může rozvinout u pacientů s těžkým poškozením imunitního systému.

Pacient, muž, 45 let, s chronickou myeloidní leukémií, 20 měsíců po alogenní transplantaci progenitorových buněk kostní dřeně od HLA identického nepříbuzného dárce byl hospitalizován (přeložen z oblastní nemocnice) ve FN pro epileptický stav. Vyšetřením MRI mozku bylo zjištěno kulovité ložisko levého thalamu velikosti 14 mm s centrálním rozpadem (plus mnohočetná další ložiska) a diagnostikována iridocyklitida.

Pacient byl opakovaně vyšetřován na toxoplazmózu metodou KFR, EIA (hranice positivity pro všechny třídy Ig 1,000) a PCR.

Výsledky ze 1/2004 (před transplantací):

KFR 1:128, IgM 0,491 negativní, IgA 0,365 negativní

Výsledky z 6/2004 (3 měsíce po transplantaci):

KFR 1: 64, IgG 4,375, IgM 0,631, IgA 0,527, IgE 0,165, IgG avidita 64,4 – vysoká; PCR z nesrážlivé krve i likvoru negativní

Výsledky z 2/2006 (při hospitalizaci):

KFR 1:512, IgG 2,216 pozitivní, IgM 4,816 pozitivní, IgA 1,555 pozitivní, IgE 1,220, IgG avidita 34,7- hraniční; PCR z krve a likvoru negativní,

PCR z biopsie mozkového ložiska pozitivní

Vyšetření 5/2006 (kontrolní):

KFR 1: 128, IgG 1,627, IgM 1,158

Závěr:

Toxoplasma gondii je intracelulární parazit, při vyšetření biologických materiálů od imunokompromitovaných pacientů je nutné respektovat skutečnost, že vyšetření likvoru není pro vyloučení infekce prvokem *T. gondii* dostatečně spolehlivé.

MUDr. Zbyněk Valenta

Centrum biologické ochrany Těchonín
561 66 Těchonín

tel.: +420-973 273 617
e-mail: zvalenta@email.cz

Toxoplazmová encefalitida u pacienta s HIV infekcí

^{1,2}Valenta, Z., ²Förstl, M., ³Kohout, A., ⁴Kapla, J.

¹*Centrum biologické ochrany Těchonín, AČR*

²*Ústav klinické mikrobiologie FN a LFUK HK*

³*Fingerlandův ústav patologie FN a LFUK HK*

⁴*Klinika infekčních nemocí FN a LFUK HK*

Abstrakt:

Je prezentován případ 40letého muže, který byl hospitalizován k chirurgickému řešení mozkového ložiskového nálezu, susp. tumoru, verifikovaného CT a MRI. Histopatologicky byla zkušeným patologem v operační biopsii zjištěna toxoplazmová etiologie a až následně potvrzena pacientova HIV-pozitivita (o které pacient věděl, ale nevedl ji). Po zákroku došlo k další progresi stavu, pravděpodobně i v důsledku rozsevu parazitů, který vyústil až v decerebraci.

Závěr:

Toxoplazmová encefalitida je považována za nejčastější příčinu úmrtí HIV-pozitivních pacientů. Představuje u nich značné riziko i přes relativně příznivé hodnoty hematologických markerů základního onemocnění, proto je třeba vést tuto komplikaci v patrnosti při diferenciální diagnostice všech mozkových ložiskových procesů.

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

Sekvenační analýza GBV-C/HGV u HIV pozitivních pacientů

Sakmaryová, I., König J., Aster V.
VIDIA-Diagnostika

V rámci řešeného grantu IGA MZ ČR : NR/9288-3

U pacientů infikovaných HIV je častá koinfekce s jinými, parenterálně přenášenými viry. Mechanismus ovlivňující replikaci při koinfekci s HIV není dosud dostatečně prozkoumán, ale z klinických pozorování je zřejmé, že koinfekce ovlivňuje délku přežití a kvalitu života HIV pozitivních pacientů. Negativní efekt je pozorován pro většinu koinfekcí hepatotropními viry (HCV, HBV), kdy je pozorováno častější snížení počtu CD4 lymfocytů a při dlouhodobém sledování i kratší doba přežívání HIV infikovaných pacientů. Naproti tomu koinfekce virem GBV-C/HGV (dále jen HGV) může mít pozitivní efekt. Většina autorů popisuje u HGV koinfikovaných HIV pozitivních pacientů dlouhodobější přežití a lepší tzv. kvalita života.

HGV je RNA virus zařazený do skupiny flaviviridae, stejně jako jeho mladší příbuzný HCV. HGV je rozšířený po celém světě jak bylo prokázáno demografickými studii. V současné době je identifikováno 6 genotypů. U genotypu 2 (evropská a americká populace), byla u subtypů 2a a 2b zjištěna průkazná souvislost s uvedeným kladným ovlivněním průběhu HIV infekce. U populace HIV negativní probíhá HGV infekce většinou inaparentně a bez následků.

Naše pracoviště úzce spolupracuje s AIDS centrem FN Bulovka při řešení výzkumného úkolu, zabývajícího se vztahem koinfekce HGV a ovlivnění prognózy pacientů s HIV infekcí. Jedním z cílů naší spolupráce je vypracování metodiky a stanovení HGV genotypu sekvenační metodou. Genotypizace hepatitidy G není ještě dostatečně prozkoumána, na rozdíl od podrobně zmapované VHB a VHC. Pro naši práci byl klíčovým úkolem výběr a ověření selektivních primerů pro RT, PCR a sekvenaci. Pro každý z uvedených kroků se nám osvědčilo použít tři odlišných dvojic primerů z konzervativní 5'UTR oblasti HGV. Pro odstranění kontaminujících reagensů, rušících finální sekvenaci, jsme s vysokou účinností a výtěžností použili po RT i PCR Sure Clean (Bioline). Po sekvenaci (ABI-Big Dye terminator verze 3.1) jsme pro přečištění využili výhody nového produktu: X Dye Terminator kit (ABI).

Pro genotypizaci HGV používáme metodu konsenzu (software DNA Star: Lasergene), tj. porovnávání námi zjištěné sekvence analýzou patientských sér s publikovanými, referenčními, sekvencemi pro jednotlivé genotypy HGV, uveřejněnými v mezinárodní databázi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Pro oblast střední Evropy je prevalentní výskyt genotypu 2, což také potvrzují naše počáteční data. Dosud se nám podařilo zařadit 15 HIV pozitivních pacientů, všichni genotypu 2. Specifikace subtypů (2a, 2b) bude náročnější vzhledem

k nízkému počtu známých referenčních sekvencí. Jejich upřesnění budeme průběžně korigovat s narůstajícím počtem vyšetřených pacientů.

Lit.: T.J.Tucker, Smuts H.E. (J.Med.Virol. 62:82-83, 2000): GBV-C/HGV genotypes: Proposed nomenclature for genotype 1-5

MUDr. František Musil

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

tel. : +420-603 213 560, 376 322 081
e-mail: musil@biolab-kt.cz

První zkušenosti s průkazem HPV metodou reverzní hybridizace

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

Česká republika patří mezi evropské země s nejvyšším výskytem karcinomu děložního čípku (KDC). Incidence je dlouhodobě kolem 20 nových případů na 100.000 žen/rok. To znamená, že se u nás KDC ročně objeví u 1000 až 1200 žen, z nichž navzdory pokrokům v onkologické terapii kolem 450 umírá.

V průběhu života ženy epitel děložního hrdla prodělává řadu změn, které mohou být provázeny metaplastickými změnami různého stupně. Bylo prokázáno, že tento nezralý metaplastický epitel je nejnepříznivěji napadnutelný vysoce rizikovými (high risk) onkogenními typy humánních papilomavirů (HPV), které mají schopnost se zabudovat do genomu buněk děložního hrdla.

Sexuálně přenášená infekce HPV je velmi častá. Odhaduje se, že až 75% všech žen je někdy exponováno infekci HPV. V dnešní aktivně sexuálně žijící populaci dívek mezi 18. až 25. rokem lze diagnostikovat tyto viry až u 30 % populace. Ve skupině 35-40 let je to již v méně než 4 %. Převážná většina HPV infekcí se spontánně vyléčí, ale perzistence HPV s vysokým rizikem (high risk, HR HPV) je signifikantním rizikovým faktorem v patogenezi prekanceróz a karcinomů děložního čípku. V této skupině výrazně dominují kromě dalších především dva nejčastější genotypy 16 a 18. Ty odpovídají nejen za asi 70 % případů KDC, ale také asi za čtvrtinu nádorů hlavy a krku, a asi 90 % zhoubných nádorů v oblasti anu a přes polovinu karcinomů vulvy a vagíny. Proto jsou dnes obě registrované vakcíny pro prevenci rakoviny děložního čípku a ostatních onemocnění způsobených papilomaviry směřovány především proti genotypům 16 a 18 (Gardasil - 16,18, 6,11 a Cervarix -16,18).

Druhá skupina HPV s tzv. nízkým rizikem (low risk, LR HPV) je často spojena pouze s benigními intraepiteliálními lézemi nízkého stupně nebo kondylomaty.

Od března 2008 je v naší laboratoři prováděn průkaz DNA HPV v biologickém materiálu molekulárně biologickou metodou reverzní hybridizace (souprava HPV-screening Human Papilloma Virus o 16 stripech – výrobce fa. GenID GmbH, distributor fa. Medisco s.r.o.). Souprava detekuje separátně skupinu vysoce rizikových genotypů (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 73, 82) a skupinu nízké rizikových genotypů (6, 11, 40, 42, 43, 44). Výhodou je navíc selektivní detekce obou nejčastějších rizikových genotypů 16 a 18. Každý strip obsahuje dvě kontrolní zóny - jedna prokazuje správné navázání konjugátu, druhá úspěšnou amplifikaci (gen GAP-DH).

Po krátkém zavedení metody bylo do konce roku 2008 vyšetřeno celkem 84 vzorků stěrů z děložního čípku. Předběžně lze ze získaných výsledků provést tyto závěry (vzorky i s hraničním nálezem byly hodnoceny jako pozitivní):

1. Vzorky byly zaslány ze sedmi gynekologických ambulancí v tomto zastoupení – 50/18/12/1/1/1/1.
2. Věkové rozmezí 84 vyšetřených žen bylo 18 až 69 roků, průměrný věk byl 33 ± 10 let.
3. Zastoupení vzorků v jednotlivých dekádách – 11-20 roků **6** vzorků (7,1 %), 21-30 roků **34** vzorků (40,5 %), 31-40 roků **28** vzorků (33,3 %), 41-50 roků **12** vzorků (14,3 %), 51-60 roků **3** vzorky (3,6 %) a ve skupině 61-70 roků **1** vzorek (1,2 %).
4. Zastoupení kompletně negativních vzorků podle dekád - 11-20 roků **2** vzorky (33,3 %), 21-30 roků **14** vzorků (41,2 %), 31-40 roků **15** vzorků (53,6 %), 41-50 roků **8** vzorků (66,7 %), 51-60 roků **1** vzorek (33,3 %).
5. Ve všech 84 vzorcích byla v různém zastoupení (LR/HR/16/18) prokázána **21x** (25,0 %) DNA LR HPV, **42x** (50,0 %) DNA HR HPV, **18x** (21,4 %) DNA HPV genotypu 16, **8x** (9,5 %) DNA HPV genotypu 18.
6. Zastoupení jednotlivých možných kombinací (LR/HR/16/18) bez ohledu na věk:
 - kompletně negativních vzorků (0/0/0/0) bylo **40** (47,6 %),
 - vzorky (+/0/0/0) s pouze LR HPV byly **2** (2,4 %),
 - vzorků (0/+/0/0) s pouze HR HPV (16 a 18 negativní) bylo **13** (15,5 %),
 - vzorků (+/+/0/0) s LR i HR HPV (16 a 18 negativní) bylo **6** (7,1 %),
 - vzorků (0/+/+/0) s HR HPV (+16 pozitivní) bylo **5** (6,0 %),
 - vzorků (+/+/+/0) s LR i HR HPV (+16 pozitivní) bylo **10** (11,9 %),
 - vzorky (0/+/0/+) s HR HPV (+18 pozitivní) byly **3** (6,0 %),
 - vzorky (+/+/0/+) s LR i HR HPV (+18 pozitivní) byly **2** (2,4 %),
 - vzorky (0/+/+/) s HR HPV (+16+18 pozitivní) byly **2** (2,4 %) - ženy 22 a 31 roků staré,
 - vzorek (+/+/+/) s LR i HR HPV (+16+18 pozitivní) byl jen **1** (1,2 %) - u ženy 19 roků staré.

Závěrem lze konstatovat, že metodologicky považujeme uvedený postup za vyhovující pro laboratoř se standardním provozem DNA diagnostiky s menším počtem vzorků s možnou dostupností výsledku již do 24 hodin (izolace DNA – amplifikační PCR – reverzní hybridizace na stripu).

Zatím nelze hodnotit úspěšnost v EHK, jejíž cyklus je objednan na příští rok (SZÚ – NRL pro HPV).

Ing. Barbara Brežná, Ph.D.

Výskumný ústav potravinársky
Priemyselná 4
824 75 Bratislava

tel.: 00421-250 237 157
e-mail: brezna@vup.sk

Dôkaz para orechov v potravinách pomocou real-time PCR

Barbara Brežná, Výskumný ústav potravinársky, Bratislava

Kvôli ochrane ľudí postihnutých potravinovými alergiami musí byť na obale potravín označené ich zloženie. Ďalej sú potrebné vhodné analytické metódy na kontrolu dodržiavania tohto pravidla. V našom laboratóriu sa venujeme vývoju analytických metód na dôkaz alergénnych surovín. Problémy a špecifiká s tým spojené budeme ilustrovať na príklade para-orechov, ktoré sú častou príčinou alergií. Selektivita novej metódy na dôkaz para orechov bola overená na súbore rastlinných a živočíšnych druhov používaných v potravinárstve. Bol zistený detekčný limit 10 pg purifikovanej DNA para orechov alebo 0,1 % obsah para orechov v zmesi. Pri testovaní komerčných výrobkov neboli zistené nijaké nezhody medzi označením výrobkov a výsledkami analýz.

Hlavní sponzor



Další sponzoři

