



ODDĚLENÍ KLINICKÉ BIOCHEMIE A DIAGNOSTIKY

SBORNÍK SDĚLENÍ

odborné konference

**RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI**

RANK 2011

2. - 3. února 2011, hotel Zlatá Štika, Pardubice

www.rank.cz

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

ODBORNÁ KONFERENCE

RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI

RANK 2011

2. a 3. února 2011
v prostorách hotelu Zlatá Štika, Pardubice

je pořádána pod záštitou MUDr. Štěpánky Fraňkové,
primátorky města Pardubice

a
MUDr. Martina Šáchy, Ph.D.,
člena představenstva, pověřeného řízením PKN a.s.

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

Vzdělávací akce je pořádána dle Stavovského předpisu č. 16 ČLK

Hlavními sponzory konference jsou společnosti

ROCHE s.r.o.

Gene Proof a.s.

Dalšími sponzory jsou společnosti :

LAB MARK a.s.

LACOMED spol. s r.o.

LABOSERV s.r.o.

ELISABETH PHARMACON spol. s r.o.

DYNEX LABORATORIES s. r.o.

Bio-Consult Laboratories spol. s r.o.

Abbott Laboratories s.r.o.

ASCOMED spol. s r.o.

GeneTiCA s.r.o.

BAG Health Care GmbH

Hlavní sponzoři



Další sponzoři



PROGRAM

2. února 2011 **středa**

10:00 – 12:30 **Registrace**

13:00 – 13:15 **Zahájení**

13:15 – 14:00 **Úvodní sdělení**

Doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D., Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové,

Klinický význam diagnostiky mutací v *K-ras* genu u kolorektálního karcinomu

14:00 – 15:50 **Analýza humánního genomu**

Vaníčková P., Drimlová V., Januška J., Branny M., Branny P., Průšová E. a Bóday A.
Laboratoř molekulární biologie, P&R Lab a.s., Komplexní onkologické centrum, Nový Jičín

Porovnávání efektivity prescreeningových metod u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií

Čejnová V., Štolba P., Harnaš V., Wilimská M., Stará M., Soukupová M., Laštůvková J.,
Oddělení lékařské genetiky, Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem,

Molekulární a cytogenetická analýza mikroleceí a přestaveb chromosomu Y u mužů s reprodukčními problémy

Dvořáková M., Soumarová R., Štursa M., Tavandzis S., Tovaryšová A., Ferák I., Drimlová V.,
Horká K. a Bóday A., Laboratoř molekulární biologie, P&R Lab a.s., Komplexní onkologické
centrum, Nový Jičín

Molekulární markery v diagnostice karcinomu prostaty a jejich využití v praxi

15:50 – 16:00 **Přestávka**

16:00 – 17:00 **Sekvenace nukleových kyselin**

Brdička R., Ústav hematologie a krevní transfuze a Ústav experimentální medicíny AVČR
Co se získanými výsledky analýzy sekvencí NK

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

Postavení sekvenční analýzy v diagnostice infekčních onemocnění

17:00 – 17:10 **Přestávka**

17:10 – 18:30 **Panelová diskuse**

Technologické a metodické pokroky v molekulární biologii
moderuje Ing. František Štumor, Ph.D., MeDiLa Pardubice

19.30 – 23.00 **Společenský večer**

3. února 2011 **čtvrtek**

8.30 – 10.00 **Diagnostika nozokomiálních infekcí**

A. Baryal, GeneProof, a.s.

Diagnostika legionelových infekcí pomocí PCR

Trubač P., Piskunova N., Šimerová E., Jakubcová M., Mikešová A., Laboratoř molekulární biologie a genetiky, Nemocnice České Budějovice, a.s.

Diagnostika *Clostridium difficile* pomocí molekulárně biologických metod

Bareková L., Zálabská E., Soudková E.

Rutiní diagnostika *Clostridium difficile* v Pardubické krajské nemocnici

10.00 – 10.15 **Přestávka**

10.15 – 12.30 **Varia**

Piknová Ľ., Janská V., Kuchta T., Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, Slovenská republika

Implementácia interného štandardu v analýze potravín polymerázovou reťazovou reakciou

Prodělalová J., Moutelíková R., Dufková L., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Detekce a molekulární analýza genomu gastroenterálních virů prasat, stanovení jejich zoonotogenního potenciálu

Hložek P., Dendis M., Bednář J., GeneProof a.s. Brno

Praktické využití výsledků PROBIT analýz pro stanovení bezpečného postupu citlivé detekce při směšování vzorků („pool“)

Němec V., Šturm F., Mencl K., Dětské oddělení, Pardubická krajská nemocnice a.s.

Boreliová artritida a její průkaz vyšetřením výpotku PCR metodou.

Mrázek J., Karasová H., Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum klinických laboratoří, Oddělení molekulární biologie

Lékové rezistence HBV a jejich diagnostika

Orságová I., Rožnovský L., Petroušová L., Mrázek J., Kloudová A., Klinika infekčního lékařství, Fakultní nemocnice Ostrava

Klinické důsledky rezistence na antivirotika při léčbě hepatitidy B

Mikalová L., Pospíšilová P., Flasarová M., Šmajš D., Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Molekulární detekce, kmenová typizace a stanovení makrolidové rezistence původce syfilis – *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* v klinickém materiálu

12.30 – 13.00 **Diskuse, závěr**

Doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

tel.: +420 495 833 040
e-mail: beranek@lfhk.cuni.cz

Klinický význam diagnostiky mutací v *K-ras* genu u kolorektálního karcinomu

Beránek M.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové, Sokolská 581, 50005 Hradec Králové

První představy o mnohastupňové molekulární podstatě rozvoje kolorektálních tumorů byly publikovány již v 80. letech minulého století. V převážné většině sporadických karcinomů objevujících se v této lokalitě je populace tumorózních buněk odvozená od jedné malignizované buňky (proces klonální expanze). Transformaci buněk tlustého střeva podmiňují a doprovázejí genetické změny v celé řadě genů s různou funkcí v organismu (*myc*, *src*, *myb*, *ras*, *erb-2*, *trk*, *p53*, *APC*, *MCC*, *DCC*, *DPC4*, *hMSH2*, *hMLH1*, *BRAF*, *PI3K*, *PKC*, *NF1* či *hsp90*).

K-ras gen (Kirsten-ras-2, lokalizace 12p12.1, velikost 38 kb) kóduje protein p21^{ras} s vnitřní GTPázovou aktivitou. Ta je nezbytná pro zajištění kontroly převodu extracelulárních signálů přes příslušné receptory v cytoplazmatické membráně a následnou aktivaci jaderných transkripčních faktorů Jun a Fos. Bodové mutace v kodonech 12, 13 a 61 způsobují ztrátu GTPázové aktivity p21^{ras} proteinu a jeho permanentní vazbu (v aktivovaném stavu s navázaným GTP) na cytoplazmatickou membránu. Aktivní konformace p21^{ras} přispívá v konečném důsledku k nekontrolované buněčné proliferaci a malignizaci střevních buněk u 30-50 % sporadicky vzniklých kolorektálních karcinomů. Stejný výskyt těchto mutací byl potvrzen také u benigních střevních adenomů. Převážná většina (přes 95 %) bodových mutací identifikovaných v genu *K-ras* se týká kodonů 12 a 13.

V laboratorní diagnostice genu *K-ras* dominovaly v 80. a 90. letech metody PCR/RFLP, ASO, ARMS a screeningové techniky SSCP, HD či DGGE. S rozvojem kapilárních genetických analyzátorů na konci 90. let vzrůstá význam přímého sekvenování PCR produktu. Základním vyšetřovaným materiálem byla v té době zejména nativní střevní tkáň odebraná chirurgicky či biopsicky, případně vzorek stolice. V období prvních let nového milénia je patrný zvýšený klinický zájem o vyšetřování mutací v genomové DNA cirkulující v periferní krvi osob s kolorektálním karcinomem. V důsledku toho byly vyvinuty citlivější analytické postupy založené na bázi PNA a LNA sond, a rozvinuta technologie real-time PCR.

Úsilí o tzv. biologickou léčbu kolorektálního karcinomu pomocí monoklonálních protilátek (cetuximab, panitumumab) proti receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) a inhibitory tyrosinkináz (erlotinib, gefitinib) otevřelo nové terapeutické možnosti, a též nové důvody pro vyšetřování mutací v *K-ras* genu. Ukázalo se, že anti-EGFR protilátky jsou u pacientů s prokázanou mutací v genu *K-ras* neúčinné. K analýze mutací se dnes používají soupravy opatřené značkou IVD diagnostiky založené na bázi real-time PCR (TheraScreen, DxS, UK) nebo reverzně hybridizační systémy (Kras StripAssay, ViennaLab, Rakousko). Oba tyto přístupy umožňují získat spolehlivé výsledky DNA analýz z jakéhokoliv nativního materiálu a z většiny parafinových tkáňových řezů.

Mgr. Pavla Vaníčková

Laboratoř molekulární biologie
P&R Lab a.s.
Komplexní onkologické centrum
Divadelní 2174
741 01 Nový Jičín

tel.: +420 556 794 230
e-mail: pavla.vanickova@onkologickecentrum.cz

Porovnávání efektivity prescreeningových metod u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií

Vaníčková P.¹, Drimlová V.¹, Januška J.², Branny M.², Branny P.², Průšová E.¹ a Bóday Á.¹
1 Laboratoř molekulární biologie, P&R Lab a.s., Komplexní onkologické centrum, Nový Jičín
2 Oddělení kardiologie, Nemocnice Podlesí a.s.

Familiární hypertrofická kardiomyopatie (HCM) je charakterizována progresivní hypertrofií levé (někdy i pravé) komory, diastolickou dysfunkcí, arytmiemi, srdečním selháním a předčasnou smrtí. Často se objevuje u mladých jedinců a mnohdy se manifestuje náhlým úmrtím. Onemocnění je heterogenní s neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou. Je dále známo, že u asi 25% jedinců s kauzálními mutacemi se nevyvinou příznaky HCM.

Dědičnost HCM je autozomálně dominantní a jeho frekvence se pohybuje kolem 1/500. Genetická heterogenita HCM je způsobena mutacemi minimálně v 12 genech kódujících proteiny sarkomerického komplexu a v dalších jiných.

Mutace ve třech genech: *MYH7* (gen kódující těžký řetězec β -myozinu), *TNNT2* (gen pro troponin T) a *MyBPC3* (gen kódující myozinový vazebný protein C) způsobují asi 2/3 všech případů HCM. Z důvodu vysoké frekvence onemocnění a genetické heterogenity je mutační analýza HCM mimořádně pracná a časově náročná. Ani klinicky dle fenotypu nelze nasměrovat molekulárně genetickou analýzu, protože neexistují specifické příznaky, které by korelovaly s mutacemi v jednotlivých genech. Jedinou možností je postupovat dle četnosti mutací v genech: *MYH7*, *TNNT2*, *MYBPC3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNI3* event. dalších. Interpretace výsledků molekulárně genetického vyšetření a predikce onemocnění je z důvodu neúplné penetrance a variabilní expresivity rovněž obtížná až na několik specifických mutací.

Tato prezentace se zabývá výsledky mutační analýzy pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Vysvětluje principy prescreeningových metod, porovnává a diskutuje senzitivitu a specifitu SSCP, DGGE a heteroduplexové analýzy a navrhuje algoritmus vyšetření u pacientů s HCM. Klade dále důraz na nezbytnou spolupráci kardiologa, klinického genetika a molekulárního genetika od diagnostiky až po interpretaci výsledků molekulárně genetických vyšetření.

Mgr. Vlasta Čejnová

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

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

Molekulární a cytogenetická analýza mikrodelecí a přestaveb chromosomu Y u mužů s reprodukčními problémy

Čejnová V.¹, Štolba P.², Harmaš V.¹, Wilimská M.¹, Stará M.¹, Soukupová M.¹, Laštůvková J.¹

1 Oddělení lékařské genetiky, Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.

2 Transfuzní oddělení, Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.

Úvod: V současné době postihuje infertilita 10-15% párů v reprodukčním věku. U přibližně 50% z nich nacházíme mužský faktor. Jednou z možných příčin mužské infertility jsou mikrodelece chromosomu Y v oblasti Yq11.23 nazvané – *azoospermia factor* (AZF). Lokus AZF je rozdělen do tří nepřekrývajících se oblastí (AZFa, AZFb, AZFc) a je důležitý pro vývoj mužských zárodečných buněk (spermatogenezi). Tyto delece jsou asociovány s azoospermií (nepřítomnost spermií v ejakulátu) nebo těžkou oligospermií (snížené množství spermií v ejakulátu). Cílem studie bylo: 1) stanovit prevalenci a typy mikrodelecí chromosomu Y u českých mužů s reprodukčními problémy; 2) popsat cytogenetické abnormality.

Soubor a metody: U 158 mužů s azoospermií a oligospermií jsme vyšetřili karyotypy a AZF mikrodelece. Pro molekulárně genetické vyšetření byla použita deoxyribonukleová kyselina (DNA) izolovaná z lymfocytů periferní krve. Metodou detekce byly dvě multiplexové polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím *sequence tagged sites* (STSs) primerů pro odhalení přítomnosti či nepřítomnosti mikrodelecí chromosomu Y (Simoni *et al.*, 1999).

Výsledky: Mikrodelece chromosomu Y byly zjištěny u 10-ti (6.33%) vyšetřovaných mužů. V jednom případě šlo o delecí AZFa, ve třech případech o delecí AZFc, ve třech případech o kombinovanou delecí AZFb+c a ve dvou případech jsme našli delecí celého lokusu (AZFa+b+c). V posledním případě jsme u jednoho muže detekovali parciální delecí v oblasti AZFb (sY134). U dvou mužů s mikrodelecemi chromosomu Y jsme diagnostikovali abnormální karyotyp. V obou případech se jednalo o mozaikový karyotyp 45,X/46,X,idic(Y) s izodicentrickým chromosomem Y tvořeným dvěma krátkými raménky a malou částí dlouhého raménka. Zároveň jsme abnormální karyotyp detekovali u dvou mužů bez nálezu mikrodelecí chromosomu Y.

Závěr: Nenalezli jsme žádné populační rozdíly v prevalenci a typech AZF mikrodelecí v porovnání s dosud publikovanými evropskými studiemi a incidence mikrodelecí zjištěná u vyšetřovaného souboru českých mužů spadá do intervalu publikovaných četností mikrodelecí chromosomu Y u infertilních mužů. Molekulárně genetická a cytogenetická vyšetření prováděná u mužů s reprodukčními problémy jsou důležitá a opodstatněná, jelikož mohou odhalit příčinu infertility a významným způsobem ovlivnit další možnou léčbu.

Mgr. Magdalena Dvořáková

Laboratoř molekulární biologie
P&R Lab a.s.
Komplexní onkologické centrum
Divadelní 2174
741 01 Nový Jičín

tel.: +420 556 794 230
e-mail: magdalena.dvorakova@pr-lab.cz

Molekulární markery v diagnostice karcinomu prostaty a jejich využití v praxi

¹Dvořáková M., ²Soumarová R., ³Štursa M., ¹Tavandzis S., ⁴Tovaryšová A., ⁵Ferák I., ¹Drimlová V.,
¹Horká K. a ¹Bóday A.

1 Laboratoř molekulární biologie, P&R Lab a.s., Komplexní onkologické centrum, Nový Jičín

2 Radioterapie a.s., Komplexní onkologické centrum, Nový Jičín

3 Urologické oddělení, NsP, Nový Jičín, Komplexní onkologické centrum, Nový Jičín

4 Cytogenetická laboratoř, P&R Lab a.s., Komplexní onkologické centrum, Nový Jičín

5 Laboratoř bioptická a cytologická, P&R Lab a.s., Komplexní onkologické centrum, Nový Jičín

Karcinom prostaty je 3. nejčastějším zhoubným nádorem u mužů a vykazuje vzrůstající trend. Incidence-za 15 let se ztrojnásobil. Frekvence vzniku nádorů prostaty roste s věkem, a to především po dosažení šedesátého roku věku. V posledních třiceti letech významně vzrůstá výskyt tohoto onemocnění i u mladších mužů, u kterých je pozorováno agresivnější chování nádoru.

V současné době je klinicky nejvýznamnějším markerem karcinomu prostaty prostatický specifický antigen (PSA). Jedná se o lidský kalikrein s aktivitou neutrální serinproteasy. Vyskytuje se ve spermatu a v nižších koncentracích také v séru. Zvýšená hodnota v séru je indikátorem přítomnosti karcinomu prostaty. Problémem je jeho nízká specifita, především při hodnotách 4-10 ng/ml což způsobuje, že cca 60-75% pacientů podstoupí zbytečně biopsii prostaty. Je to dáno tím, že hladina PSA je zvýšena i při zánětlivých procesech, mechanickém podráždění instrumentálním vyšetřením v oblasti prostaty apod.

Z tohoto důvodu se hledají nové markery, které vykazují vyšší senzitivitu a specifitu. Jedním z nich je PCA3 (DD3) - prostate cancer antigen 3 (differential display code 3). Produkt tohoto genu je orgánově specifický, jeho exprese je omezena na prostatu, a je úzce svázán se vznikem karcinomu prostaty. Je zajímavé, že proteinový produkt PCA3 nebyl nalezen. Při vyšetření v moči se paralelně sleduje hladina PCA3 mRNA a PSA mRNA. Pro vyhodnocení získaných výsledků se používá tzv. „PCA3 skóre“, které je poměr mezi PCA3 mRNA a PSA mRNA násobený 1000. Senzitivita a specifita tohoto testu je vyšší než při vyšetření PSA a pohybuje se kolem 65% respektive 66%.

Důležitými molekulárními markery jsou fúzní geny TMPRSS2-ERG a TMPRSS-ETV. Jejich detekce v moči upřesňuje diagnózu zejména u pacientů s normálními hodnotami PSA i PCA skóre (5 až 10% pacientů - falešná negativita).

Tato prezentace se zabývá výsledky a možnostmi laboratorních analýz u pacientů s podezřením na karcinom prostaty. Poukazuje na důležitost vyhledávání molekulárních markerů, které upřesňují výsledky klinických vyšetření a upřesňují prognózu. Dále diskutuje možné výhody využití nalezených konkrétních molekulárních markerů u pacientů při sledování úspěšnosti léčby.

Prof. MUDr. Radim Brdička, DrSc.

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

tel: +420 221 977 219
e-mail: Radim.Brdicka@uhkt.cz

Co se získanými výsledky analýzy sekvencí NK

Brdička R.
Ústav hematologie a krevní transfuze a Ústav experimentální medicíny AVČR

Za předpokladu, že sekvenční nález byl získán postupem, jehož **validita** byla ověřena adekvátním způsobem, je dalším krokem laboratorního vyšetřování

- 1. Interpretace analytická**, na kterou navazuje
- 2. Interpretace klinická**, za kterou již není odpovědná laboratoř, ale k tomu určené klinické pracoviště, které obvykle i o vyšetření požádalo.

Součástí analytické interpretace je zhodnocení technické kvality výsledku, která je nepoměrně snazší u klasických sekvenačních metod, kdy např. výsledkem kapilární elektroforézy jsou křivky, které dovolují i korekci přístrojem odečtené sekvence. Mnohem obtížnější je situace u přístrojů „nové“ generace, u nichž jsme odkázáni na vnitřní integrovanou kontrolu procesu., který obvykle využívá mnohonásobné opakování.

Za předpokladu, že výsledky analýzy akceptujeme, je následujícím krokem porovnání se standardní sekvencí, která v případě lidského genomu je již dostupná i v podobě různých identifikovaných odchylek (mutací). Pokud dojde k situaci, kdy námi nalezená sekvence byla již popsána, je analytická interpretace u konce. K potvrzení nálezu je obvykle třeba provést další vyšetření na druhém vzorku téže osoby. Získáme-li stejný výsledek můžeme se pokusit odhadnout funkční význam nalezené odchylky. Jak podle jejího umístění - v kódující oblasti hodnotíme změnu aminokyselinového složení, případně zkrácení vznikem STOP kodonu -, (i synonymní mutace mohou mít vliv na proteosyntézu).

Změny v oblastech, které mohou mít význam pro činnost stříhového mechanismu což je ověřováno na úrovni proteinové, nebo v regulačních úsecích atd.) tak podle rozsahu odchylky.

V posledních letech provedená celogenomová sekvenování odhalila, že odchylek od standardního zárodečného jaderného genomu, které nebyly zatím popsány je velké množství, zvláště hodnotíme-li rozdíly mezi zárodečným genomem a genomem somatických (nádorových) buněk. Zároveň je zřejmé, že zhodnocení (manipulace s výsledky) začíná narážet na výkonnost současných počítačových systémů.

<http://www.currentprotocols.com/protocol/hg1707>

Kobolt C., et al.: Challenges of sequencing human genomes.
Briefing in Bioinformatics 2010

Chen JM., et al.: Revealing the human mutome. Clin.Genet.2010

PharmDr. Lenka Plíšková

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

tel.: +420 495 833 894 (3 866)
e-mail: pliskova@lfhk.cuni.cz

Postavení sekvenační analýzy v diagnostice infekčních onemocnění

Plíšková L.¹, Bolehovská R.¹, Ryšková L.²

1 Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF a FN Hradec Králové

2 Ústav klinické mikrobiologie LF a FN Hradec Králové

Sekvenační techniky mají v dnešní době velké množství aplikací ve vědě, medicíně, ale i v kriminalistice. Rozvoj těchto metod umožnil rozluštit nejen lidský genom, ale i genom řady mikroorganismů. Zároveň však vyvolal revoluci v diagnostice chorob a možnostech jejich cílené terapie.

Sekvenaci je možné v dnešní době využít i v mikrobiologii, a to ve třech základních oblastech: určení etiologického agens probíhajícího infekčního onemocnění (identifikace původce z biologického materiálu nebo druhové dourčení původce z kmenů), zjišťování rezistencí a v neposlední řadě v oblasti epidemiologie.

V první oblasti se využívá „broad-range“ PCR s primery nejčastěji z oblasti 16S rDNA pro detekci všeobecné bakteriální DNA s následnou sekvenací pro určení původce infekce. Sekvence 16S rDNA má řadu praktických využití jako např. identifikace pomalu rostoucích až nekultivovatelných bakterií, možnost identifikace původce infekce i po antibiotické terapii apod. Tento postup má však i řadu limitací.

Při zjišťování rezistencí se naopak využívá primerů z oblasti konkrétních genů, kde se následně při sekvenační analýze hledá bodová nebo bodové mutace (např. rezistence na lamivudin při léčbě hepatitidy B apod.). Poslední oblast (epidemiologie) se v rutinních molekulárně biologických laboratořích provádí méně často.

V přednášce bude zmíněno kromě možnosti využití sekvenace v mikrobiologické diagnostice infekčních onemocnění a rezistencí také několik kazuistik.

Mgr. Atal Baryal

GeneProof, a.s.
Viniční 235
615 00 Brno

tel.: +420 602 246 849
e.mail: baryal@geneproof.com

Diagnostika legionelových infekcí pomocí PCR

Baryal A.
GeneProof a. s.

Bakterie rodu *Legionella* se zcela běžně vyskytují v přírodních i umělých vodních zdrojích, kde s oblibou parazitují uvnitř buněk améb či jiných prvoků tvořících vodní biofilm. Kolonizace vodovodního potrubí a rozvodů teplé vody nejsou žádnou výjimkou, oportunně tak může docházet infekcím dýchacích cest člověka končících fatálními následky až ve 20 % případů.

Současné mikrobiologické a serologické metody detekce v diagnostice legionelóz jsou časově i technicky náročné a často neposkytují dostatečnou specifitu a citlivost. Naopak aktivně se rozvíjející metody molekulární mikrobiologie umožňují přímou detekci bakteriální DNA pomocí metody real-time PCR a nabízí tak rychlé a spolehlivé řešení pro přímý průkaz přítomnosti legionel ve vzorku.

V rámci zpracování diplomové práce byly v naší laboratoři vyvinuta metoda detekce legionel se zaměřením na rozlišení mezi *Legionella pneumophila* a *Legionella species* pomocí real-time PCR. Odporující předpokladu, výsledky vyšetření pacientů s diagnózou atypické pneumonie ukázaly, že *L. pneumophila* není zdaleka jedinou ani nejčastěji detekovanou legionelou v klinickém materiálu.

Mgr. Pavel Trubač

Laboratoř molekulární biologie a genetiky
Nemocnice České Budějovice, a.s.
B. Němcové 54
370 01 České Budějovice

tel.: +420 387 873 021
e-mail: trubac@nemcb.cz

Diagnostika *Clostridium difficile* pomocí molekulárně biologických metod

Trubač P., Piskunova N., Šimerová E., Jakubcová M., Mikešová A.
Laboratoř molekulární biologie a genetiky, Nemocnice České Budějovice, a.s.

Střevní onemocnění vyvolaná *Clostridium difficile* - CDAD (*Clostridium difficile* associated disease) - se dnes stávají vážným problémem u hospitalizovaných pacientů s předchozí antibiotickou terapií či u imunosuprimovaných pacientů a patří k častým komplikacím léčby. Tyto infekce, způsobené často vysoce virulentními a rezistentními kmeny, se tak řadí mezi velice vážné nozokomiální nákazy. Proto je zapotřebí rychlá, přesná a citlivá diagnostika hypervirulentních kmenů a epidemiologická charakterizace zachycených rybotypů.

K tomuto účelu jsme na našem pracovišti vyzkoušeli několik molekulárně biologických metod na detekci *Clostridium difficile*, popřípadě detekci klostridiálních toxinů a charakterizaci kmenů pomocí sekvenace ribozomální RNA. Jako nejvýhodnější se ukázal systém GeneXpert firmy Cepheid, který detekuje geny pro cytotoxin B, binární toxin CDT a mutaci v regulačním genu *tcdC*, zapříčiňující zvýšenou tvorbu toxinů. Dva kmeny, u kterých byla prokázána přítomnost obou toxinů i delece v toxinovém represoru, byly odeslány na rybotypizaci do laboratoře v Leidenu, kde byly dourčeny jako rybotyp 176, který se vyskytuje na našem území a je velmi podobný rybotypu 027 svými biologickými vlastnostmi včetně vysoké virulence. Systém GeneXpert je sice poměrně nákladná, ale velice citlivá, přesná a rychlá (1 hodina) metoda použitelná zejména při statimových vyšetřeních klinických vzorků a při confirmaci bakteriologického nálezu toxinů a rezistence na antibiotika. Zejména z epidemiologického hlediska je třeba přesně interpretovat získaná data, neboť nález mutace v regulačním genu je prezentován jako potenciální rybotyp 027 (souprava je vyráběna v USA, kde je velká korelace mezi přítomností mutace a rybotypem 027). Byly však již popsány i jiné rybotypy nesoucí tuto mutaci, a tak by u každého takového kmenu měla následovat další charakterizace prováděná referenční laboratoří.

MUDr. Lucie Bareková

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

tel.: +420 466 013 207
e-mail: lucie.barekova@nemocnice-pardubice.cz

Rutinní diagnostika *Clostridium difficile* v Pardubické krajské nemocnici

¹Bareková L., ¹Zálabská E., ²Soudková E.

1 Oddělení klinické mikrobiologie, Pardubická krajská nemocnice, a.s.

2 Laboratoř molekulární biologie, MeDiLa spol. s r.o., Pardubice

Clostridium difficile je grampozitivní anaerobní sporulující bakterie vyvolávající převážně postantibiotické průjmy různé intenzity a v případě těžkých forem infekce je původcem pseudomembranózní kolitidy. Problematika *Clostridium difficile* je ve zdravotnických zařízeních aktuálním tématem, dosahuje srovnatelné úrovně závažnosti jako infekce způsobené MRSA nebo kmeny produkující ESBL. Představuje hrozbu především pro pacienty po invazivních výkonech na oddělení chirurgie, pro pacienty onkologické, imunosuprimované, polymorbidní, geriatrické, nebo pro osoby s častou preskripcí antibiotik v anamnéze. Šíření infekce výrazně usnadňuje schopnost *C. difficile* vytvářet endospory, které velmi dobře přežívají v prostředí a jsou odolné vůči dezinfekčním látkám. Patogenní působení *C. difficile* je způsobeno produkcí enterotoxinu (toxin A) a cytotoxinu (toxin B), které poškozují a destrukují střevní stěnu. Problémem je narůstající výskyt hypervirulentních kmenů (např. ribotyp 027) produkujících vyšší množství toxinů.

Na Oddělení klinické mikrobiologie Pardubické krajské nemocnice se rutinně provádí stanovení toxinu A, toxinu B a antigenu *C. difficile* ze vzorků stolice pomocí imunochromatografických a EIA metod. Kromě těchto metod je zaveden i kultivační průkaz *C. difficile* z výtěrů z rektu.

Vzhledem k vzrůstajícímu počtu pacientů s onemocněním vyvolaným *C. difficile*, byla pro Pardubickou krajskou nemocnici zavedena molekulárně biologická detekce DNA toxigenních kmenů *C. difficile*. Pro urgentní detekci DNA je využívána real-time PCR na přístroji GeneXpert (detekce genu pro toxin B, binární toxin a genu s mutací v *tcdC* – předpokládaný ribotyp 027) umístěném v současné době na mikrobiologickém oddělení. Další možností je detekce DNA toxigenních kmenů *C. difficile* (oblast regulačního genu *tcdC* a oblast s mutací v *tcdC*) na přístroji LightCycler v laboratoři molekulární biologie.

V přednášce bude prezentován soubor pacientů, u kterých byl v období od ledna do listopadu 2010 odebrán biologický materiál pro podezření na klostridiovou infekci. Bude uvedena krátká kazuistika.

RNDr. Ľubica Piknová, Ph.D.

Výskumný ústav potravinársky
Priemyselná 4,
824 75 Bratislava
Slovenská republika

tel.: +421 250 237 157

e-mail: lpiknova@vup.sk

Implementácia interného štandardu v analýze potravín polymerázovou reťazovou reakciou

Piknová Ľ., Janská V., Kuchta T.
Výskumný ústav potravinársky, Bratislava

Metódu PCR vo verzii s priebežným meraním fluorescencie (tzv. real-time PCR) je možné využiť nielen na kvalitatívnu ale aj kvantitatívnu analýzu DNA obsiahnutej v zložkách potravinovej vzorky. Kvantitatívne nasadenie real-time PCR na analýzu potravín však komplikuje relatívne nízka a málo reprodukovateľná výťažnosť DNA z potravinových matric. Vzhľadom na veľkú variabilitu výťažnosti z DNA nielen medzi rôznymi potravinovými matricami, ale dokonca aj v rámci jedného druhu potravinovej matrice, nie je možné použiť plošnú korekciu výťažnosti. Pri vhodnom usporiadaní real-time PCR (tzv. duplex PCR s použitím fluorescenčne označenej hydrolyzačnej sondy typu TaqMan – v jednej skúmavke prebiehajúca reakcia detegujúca 2 rôzne templáty) je možné použiť koncept interného štandardu. Uvedený spôsob detekcie je možný, ak s použitím duplexného systému real-time PCR so sondami označenými odlišnými fluorescenčnými farbivami a vypočítaním rozdielu tzv. threshold cyklov. Analogicky ako pri chemických metódach analýzy sa treba zohľadniť splnenie požiadaviek na interný štandard, ktorý má byť podobnej chemickej povahy ako cieľový analyt, podliehať rovnakým procesom ako cieľový analyt počas celého postupu stanovenia (počas extrakcie i analýzy), byť nezávisle analyzovateľný s rovnakou účinnosťou ako cieľový analyt a byť obsiahnutý vo vzorke v koncentrácii poriadkovo rovnakej ako cieľový analyt. Jednou z možností je aplikovať endogénny interný štandard, t. j. druhú reakciu v duplexnej PCR orientovanú na niektorú sekvenciu DNA, ktorá sa nachádza v každej vzorke. Vhodný interný štandard umožní podstatné zlepšenie parametrov extrakcie DNA a umožní kvantifikáciu pomocou real-time PCR.

Funkciu endogénneho interného štandardu spĺňa gén alebo zložka potravinového produktu, ktorá je jeho prirodzenou súčasťou. Napríklad pri analýze orechov v pekárenských výrobkoch môže byť endogénnym interným štandardom pšenica, keďže je prítomná v každom výrobku. V kvalitatívnej analýze neznámych vzoriek je prítomnosť DNA z pšenice využiteľná aj ako amplifikačná kontrola priebehu real-time PCR. Relatívna kvantifikácia s použitím pšenice ako interného štandardu sa dá uskutočniť z vypočítania korekcií z hodnôt tzv. prahových cyklov pšenice a skúmaného analytu v duplexnej reakcii s použitím dvoch fluorescenčných farbív.

Ďalšou možnosťou je použitie exogénneho interného štandardu. Ak sa použije analyt v známom množstve spoľahlivo odlišiteľný od neznámych analytů, možno predpokladať, že počas extrakcie DNA sa budú správať rovnako. Známe dáta o extrakcii známeho analytu sa porovnajú s dátami neznámej vzorky a určí sa jej relatívne množstvo.

Uvedené metódy môžu byť použité na detekciu a kvantifikáciu alergénov v potravinách a na zisťovanie falšovania potravín.

RNDr. Jana Prodelalová, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Oddělení virologie a diagnostiky
Hudcova 70
621 00 Brno

tel.: +420 533 331 101
e-mail: prodelalova@vri.cz

Detekce a molekulární analýza genomu gastroenterálních virů prasat, stanovení jejich zoonotogenního potenciálu

Prodelalová J., Moutelíková R., Dufková L.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

U hospodářských zvířat se setkáváme s řadou virových druhů, které se replikují v orgánech nebo tkáních zažívacího traktu, jsou primárně vylučovány prostřednictvím fecés a přežívají po týdny například v odpadních vodách. Patří-li tyto druhy mezi odolné zoonotogenní viry, mohou vyvolat sporadické infekce nebo epidemie z kontaminované vody či z kontaminovaných potravin.

Jak vyplývá z více než 400 vyšetření vzorků trusu selat z chovů postižených průjemným onemocněním pomocí elektronové mikroskopie, viroví původci byli prokázáni ve 25-30% případů. Mezi časté gastroenterální viry, jejichž průkazem a diagnostikou se v naší laboratoři zabýváme, patří rota- a koronaviry, kaliciviry, astroviry a virus hepatitidy E (HEV).

Rotaviry skupiny A patří mezi významné virové původce gastroenteritid prasat. Tato viry jsou díky své bezobalové morfologii velmi rezistentní, zejména ve vlhkém prostředí. Doba přežívání virových částic na lidských rukou je až několik hodin a ve vodě až několik týdnů. Segmentovaná RNA rotavirů snadno podléhá genetickým změnám a vzájemné srovnání genomových sekvencí lidských a zvířecích rotavirů často odhalí blízkou příbuznost. Vedle nejčastěji prokazovaných rotavirů skupiny A byl u prasat v České republice identifikován pomocí elektroforetypizace a metodami molekulární virologie *Rotavirus* skupiny C, který byl spojován s výskytem gastroenteritid u dětí školního věku.

Pomocí nested RT-PCR byl v naší republice nedávno poprvé prokázán *Calicivirus* ve fecés prasat. Z hlediska etiologie gastroenteritid zvířat a lidí jsou významné kaliciviry rodu *Sapovirus* a *Norovirus*. Noroviry jsou častým původcem akutních gastroenteritid nebakteriálního původu u lidí. Genetická příbuznost lidských a prasečích kalicivirů a častý průkaz protilátek proti lidským norovirům u prasat vzbuzují úvahy o možné úloze prasat v mezidruhovém přenosu kalicivirů a o možnosti vývoje jejich nových mezidruhových variant.

Virus HEV se šíří fekálně-orální cestou a rozsáhlejší epidemie způsobené tímto virem jsou většinou spojené s kontaminací užitkové i pitné vody. Těsná genetická příbuznost mezi prasečími a lidskými viry hepatitidy E naznačuje, že prase je pravděpodobným rezervoárem HEV a prasečí odpady mohou být zdrojem virové kontaminace např. zavlažovacích vod. Přibývající nálezy HEV v chovech prasat nebo na jatkách a ve vodotečích v některých zemích Evropy nebo u lovné zvěře v Japonsku ukazují, že endemické rozšíření HEV infekcí se nevyhýbá ani vyspělejším industrializovaným zemím.

RNDr. Pavel Hložek

GeneProof, a.s.
Viniční 235
615 00 Brno

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

Praktické využití výsledků Probit analýz pro stanovení bezpečného postupu citlivé detekce při směšování vzorků („pool“)

¹Hložek P., ¹M. Dendis, J. Bednář²
1 GeneProof a.s.
2 FSI, VUT v Brně

V posledním desetiletí došlo v mikrobiologické a genetické diagnostice k masivnímu vývoji technologií využívajících metod molekulární biologie a genového inženýrství.

Po překlenutí poměrně dlouhého období vývoje těchto metod ze strany jejich primární optimalizace, charakterizace a převodu do stavu rutinního použití byly určeny nutné podmínky pro jejich použití v praxi. Pro stanovení těchto podmínek byly následně definovány (v molekulární mikrobiologii) základní parametry těchto metod obdobně jako v např. v biochemii. Do popředí se tak dostala například přesná charakterizace citlivosti a přesnosti měření. Pro stanovení těchto ukazatelů jsou dnes využívány již poměrně standardizované statistické modely, u kterých ovšem často chybí důkladná interpretace dosažených výsledků, což snižuje jejich praktickou využitelnost.

Typickým příkladem je využití statistického modelu Probit analýzy, který je dnes běžně používán pro určení citlivosti měření při použití Real Time PCR metod. Vzhledem k tomu, že se jedná o pravděpodobnostní model, je často obtížné prakticky určit reálnou citlivost metody v rutinním provozu. Navíc jakákoliv další práce s daty určujícími citlivost je opět zatížena zmíněným hodnocením v poli pravděpodobnosti.

Při vědomí výše uvedených problémů s interpretací dat jsme v naší laboratoři vytvořili na základě výsledků Probit analýzy teoretický model pro výpočet bezpečné detekce nízkých (definovaných) hladin patogenů za předpokladu směšování vzorků. Praktické využití tohoto modelu jsme následně experimentálně ověřili na definovaném počtu vzorků.

Práce byla prováděna za podpory dotačních programů:
MPO ČR č. FI-IM5/042
MPO FR-TI1/391

MUDr. Vladimír Němec, Ph.D.

Dětské oddělení
Pardubická krajská nemocnice, a.s.
Kyjevská 44
532 03 Pardubice

tel.: +420 466 015 401
e-mail: vladimir.nemec@nemocnice-pardubice.cz

Boreliová artritida a její průkaz vyšetřením výpotku PCR metodou.

¹Němec V., ²Šturm F., ³Mencl K.

1 Dětské oddělení, Pardubické krajské nemocnice a.s.

2 MeDiLa spol. s r.o., Pardubice

3 Oddělení klinické mikrobiologie, Pardubická krajská nemocnice a.s.

Borelióza je komplexní chorobou, která se projevuje zejména postižením kožním, kloubním, neurologickým, ale je možné i méně časté postižení srdce a oka, případně postižení plodu v těhotenství. Kloubní projevy boreliózy jsou spojovány již s prvními popisy tohoto onemocnění. Není jasné, u kolika dětí s boreliovou artritidou předcházelo erythema migrans, ale je známo, že asi polovina dětí s prokázaným kloubním onemocněním nemá v předchorobí žádný jiný projev boreliové infekce.

Boreliová artritida se projevuje většinou jako epizodický zánět kloubu, který může přejít i do chronického stádia. Typicky onemocnění postihuje starší děti (nad 12 let), nejčastěji postiženým kloubem je koleno (70-90%), dále kotník či loket. Klouby jsou zduřelé, bolí, častěji jsou zarudlé, bývá výpotek a je porušena funkce kloubu. Zánět kloubu ustupuje po antibiotické terapii často pomalu a asi u 10% nemocných dětí se vyvíjí chronická erozivní artritida, která se těžko odlišuje od juvenilní idiopatické artritidy a vyžaduje i komplexní terapii (kortikoidy, cytostatika).

Diagnostika onemocnění je založena na typickém klinickém obrazu a nepřímých metodách založených na stanovení protilátek třídy IgG a IgM imunofluorescencí a vyšetřením specifických antigenů OspA, OspB, OspC, BamA, MEP a reaktivity proti dalším proteinům 41kD, 58kD, 60kD, 66kD, a 72kD novou generací ELISA testů. Další možností je průkaz přítomnosti specifické DNA molekulárně biologickými postupy (PCR).

Autoři uvádějí svoje zkušenosti s diagnostikou boreliové infekce u svých 7 pacientů.

Věnují pozornost klinické diagnostice. Laboratorní vyšetření prokazují u všech pacientů pozitivní nález protilátek v séru v třídě IgG a negativní nález v IgM. U všech pacientů je vyšetřen i kloubní výpotek, kde u všech prokázány protilátky v třídě IgG a u (5) pacientů hladina kloubních protilátek převyšuje významně hladinu protilátek sérových. Vyšetření metodou Western blot (WB) je pozitivní nález v séru u 6 pacientů (u zbývajících pacientů je pozitivní nález ve výpotku) a vyšetření WB ve výpotku je pozitivní u všech 7 vyšetřených pacientů. Všechny kloubní výpotky byly vyšetřeny na přítomnost borelií a DNA byla prokázána u 2 pacientů (tj. 28,5%).

Stanovení borelií ve výpotcích je prováděno diagnostickou soupravou ARTUS Borrelia LC PCR kit (výrobce Qiagen, Německo) na přístroji Light Cycler I (výrobce ROCHE, Švýcarsko). Amplifikovaná a detekovaná oblast genomu je dlouhá 102 bp, výrobce ji však blíže nespecifikuje. Souprava detekuje borelie ze skupiny B. burgdorferi sensu lato (bez rozlišení): B. burgdorferi, B. garinii, B. afzelii, B. valaisiana, B. hermsii. Analytická senzitivita (dle výrobce) je 3,34 kopií/ul reakce (p=0,05). Izolace NK se provádí na kolonkách Qiagen. Vnitřní kontrola slouží k odhalení inhibic a také ke kontrole správnosti izolace.

Závěr: Správná diagnostika boreliové artritidy je závislá na správném zhodnocení klinického obrazu, průkazu protilátek proti boreliím ve třídách IgG případně IgM, průkazu přítomnosti antigenů borelií metodou Western blot. Vyšetření výpotku metodou PCR se jeví jako vhodný způsob diagnostiky zejména tam, kde výsledky předchozích vyšetření jsou hraniční. Je třeba mít na paměti, že pozitivita podle našich zkušeností je pouze u cca 30% pacientů a negativní nález přítomnost tohoto onemocnění nevylučuje.

Mgr. Jakub Mrázek

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

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

Lékové rezistence HBV a jejich diagnostika

Mrázek J., Karasová H.
Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum klinických laboratoří, Oddělení molekulární biologie

Chronická infekce virem hepatitidy B (HBV) patří celosvětově svým rozsahem i závažností mezi jeden z nejvýznamnějších zdravotních problémů. Použití antivirových preparátů (nukleotidová a nukleosidová analoga) je v léčbě chronické infekce HBV důležitým nástrojem pro zastavení progresu onemocnění. Virus však tvoří pod tlakem antivirové léčby celou řadu mutací, které vedou k rezistenci viru vůči použitým lékům a komplikují tak možnosti dalšího zvládnutí infekce.

Mutace HBV asociované s lékovou rezistencí vznikají v genu kódujícím HBV polymerázu, který je tak vhodným cílem pro molekulárně biologické testy umožňující prokázání genetického podkladu vznikajících rezistencí. Mezi nejvyužívanější postupy patří analýza úseku genu HBV polymerázy metodou reverzní hybridizace (line probe assay, LiPA) či sekvenací.

Za účelem rutinní diagnostiky rezistentních kmenů HBV využívá naše laboratoř INNO-LiPA HBV DR v2 strip (LiPA), který umožňuje průkaz nejvýznamnějších popsanych mutací asociovaných s rezistencí k lamivudinu, adefoviru, entecaviru, telbivudinu, tenofoviru a emtricitabinu.

Laboratorní průkaz genetického podkladu rezistence HBV umožňuje včasnou optimalizaci antivirové léčby a zefektivnění péče o pacienta.

MUDr. Irena Orságová

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

tel.: +420 723 667 313
e-mail: irena.orsagova@fno.cz

Klinické důsledky rezistence na antivirotika při léčbě hepatitidy B

¹Orságová I., ¹Rožnovský L., ¹Petroušová L., ²Mrázek J., ³Kloudová A.

1 Klinika infekčního lékařství, Fakultní nemocnice Ostrava

2 Oddělení molekulární biologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

3 Oddělení imunologie a alergologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Virová hepatitida B představuje závažný zdravotnický problém. Celosvětově je chronicky infikováno virem hepatitidy B asi 350 milionů lidí, což je asi 5x více než HIV. Česká republika patří mezi státy s nízkou prevalencí infekce virem hepatitidy B (HBV). Podle posledních sérologických přehledů z roku 2001 je 0,56 % našich občanů chronicky infikováno HBV. V posledních letech je ročně hlášeno 300-400 případů akutních virových hepatitid B. Do chronického stadia přejde méně než 5 % akutních hepatitid B u dospělých pacientů, ale až 90 % akutních hepatitid B u dětí. Primárním cílem protivirové léčby hepatitidy B je redukce hladiny HBV DNA, tj. vymizení či výrazné potlačení virové replikace a její udržení na minimální možné úrovni co nejdéle, nejlépe trvale. Dosažení tohoto cíle je spojeno s histologickým zlepšením, poklesem až normalizací aktivity aminotransferáz a snížením rizika rozvoje hepatocelulárního karcinomu. V léčbě chronické hepatitidy B je od 90. let minulého století využíváno protivirového účinku interferonu alfa a od konce 90. let také nukleosidových a nukleotidových analog. Prvním preparátem z této řady je lamivudin, který sice vede k rychlému poklesu virémie, ale jeho nevýhodou je časný rozvoj rezistence HBV, do 5 let vzniká asi u 2/3 pacientů. Proto je postupně z léčby chronických hepatitid vytlačován a nahrazován novějšími preparáty s výhodnějším profilem. Lamivudin je v současnosti spíše používán u akutních hepatitid B s těžkým průběhem a spolu s hyperimunním globulinem jako prevence rekurence hepatitidy B u pacientů po transplantaci jater. Ve sdělení je prezentován soubor 103 pacientů s chronickou a 34 pacientů s akutní hepatitidou B, kteří byli léčeni lamivudinem. Pro rozvoj rezistence byl lamivudin nahrazen nebo rozšířen o další antivirotika. U 27 pacientů byl použit adefovir, u 5 pacientů entecavir a u 3 pacientů tenofovir. Rozšíření spektra protivirových preparátů a dostupnost stanovení rezistence na jednotlivá antivirotika umožňuje efektivní změnu protivirové léčby pacientů s chronickou hepatitidou B.

Mgr. Lenka Mikalová

Biologický ústav
Lékařská fakulta
Masarykova univerzita
Kamenice 753/5,
625 00 Brno

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

Molekulární detekce, kmenová typizace a stanovení makrolidové rezistence původce syfilis – *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* v klinickém materiálu

Mikalová L., Pospíšilová P., Flasarová M., Šmajs D.
Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Diagnostika onemocnění syfilis se zakládá především na serologii. Serologické testy ovšem neumožňují získat informace užitečné pro epidemiologický kontext tohoto onemocnění. S rozvojem molekulární biologie a diagnostiky lze detegovat genetický materiál původce syfilis – *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* - v některých typech klinického materiálu a získat epidemiologické informace, stejně jako stanovit rezistenci k antibiotikům. Klasický přístup pro stanovení rezistence k antibiotikům není možné u treponemat použít, neboť tyto bakterie nelze kultivovat v podmínkách *in vitro*. Molekulární detekce treponemální DNA prostřednictvím PCR stále představuje nadstandardní vyšetření zejména kvůli limitacím jejího použití (nutnost získání materiálu obsahujícího treponemální DNA), nicméně tento přístup umožňuje typizaci klinických izolátů a detekci stále častěji se vyskytující rezistence *T. pallidum* k makrolidovým antibiotikům.

Cílem této práce bylo izolovat a detegovat DNA původce syfilis z různých typů klinického materiálu od pacientů v různých stádiích syfilis a získané izoláty kmenově typizovat. Primární detekce treponemální DNA u klinických vzorků zahrnovala dvoukrokovou PCR lokusů *poIA* (TP0105), kódující DNA polymerázu I a *tmpC* (TP0319), kódující membránový lipoprotein. Kmenová typizace byla založena na amplifikaci dvou sekvenčně variabilních úseků genů TP0136 a TP0548 a následné sekvenaci těchto lokusů dideoxyterminátorovou metodou. Makrolidová rezistence, která je způsobena přítomností mutací A2058G nebo A2059G v genu 23S rDNA, byla vyšetřována amplifikací a následnou restriční analýzou této oblasti restričními enzymy *MbolI/BsaI*.

V letech 2004 – 2010 bylo shromážděno 86 PCR pozitivních vzorků od 66 pacientů z různých regionů České republiky. Vyšetřeny byly 4 typy klinických materiálů: celkem 59 stěrů z kožních a slizničních lézí, 24 vzorků plné krve, 1 sérum a 2 vzorky mozkomíšního moku. Sekvence lokusů TP0136 a TP0548 byly ve všech vyšetřených izolátech identické nebo velmi podobné příslušným sekvencím kmene SS14, žádný z izolátů nebyl sekvenčně podobný kmeni Nichols. Blízká sekvenční příbuznost v lokusech TP0136 a TP0548 s kmenem SS14 byla nalezena u 7 pacientů. Celkem 24 pacientů (36,36 %) bylo rezistentních k makrolidům, přičemž 13 pacientů bylo infikováno kmenem s mutací A2058G, 11 pacientů kmenem s mutací A2059G. Ostatní kmene *T. pallidum* byly k makrolidům senzitivní.

Zavedli jsme nový typovací systém založený na amplifikaci sekvenčně variabilních lokusů TP0136, TP0548 a lokusu makrolidové rezistence s diskriminační schopností 8 subtypů na doposud 51 sekvenovaných vzorků. Geneticky kódovaná rezistence k makrolidům je u původce syfilis v České republice relativně častá (36,36 %). Tato vysoká pravděpodobnost selhání léčby makrolidy zdrazňuje nutnost použití nemakrolidových antibiotik eventuelně následné kontroly úspěšnosti makrolidové léčby u pacientů se syfilis.

Tato práce byla podporována granty GAČR č. 310/07/0321a IGA MZ ČR č. NT11159-5/2010.

Organizační výbor konference:

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

Odborný garant konference:

Prof.MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

Sborník vydal:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 70
621 00 Brno

ISBN 80-86895-25-4