



SBORNÍK

9. ročníku odborné konference

**RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI**

RANK 2013

30. a 31. ledna 2013, hotel Zlatá Štika, Pardubice

www.rank.cz

Organizační výbor konference:

Ing. František Štumor, Ph.D.
Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.
Ing. Jaroslava Vávrová, Ph.D.
PharmDr. Jiří Skalický, Ph.D.
Ing. Barbara Štumrová
Alena Novotná

Odborný garant konference:

Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

Sborník vydal:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno

ISBN 80-86895-28-9

Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP

MeDiLa spol. s r.o., Štrossova 239, 530 03 Pardubice

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 2013

**30. a 31. ledna 2013
v prostorách hotelu Zlatá Štíka, Pardubice**

Záštitu nad konferencí převzali:

MUDr. Štěpánka Fraňková, primátorka města Pardubice

MUDr. Tomáš Gottvald, ředitel Pardubické krajské nemocnice, a.s.

PharmDr. Jiří Skalický, Ph.D., poslanec PSP ČR

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

GeneProof a.s.

ROCHE s.r.o.

Dalšími sponzory jsou společnosti

BAG Health Care GmbH

BIOMEDICA ČS s.r.o.

ELISABETH PHARMACON spol. s r.o.

LAB MARK a.s.

M.G.P. spol. s r.o.

OXOID CZ s.r.o.

Bio-Consult Laboratories spol. s r.o.

DYNEX LABORATORIES s. r.o.

GeneTiCA s.r.o.

LABOSERV s.r.o.

MEDISCO Praha s.r.o.

TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

PROGRAM

30. ledna 2013 **středa**

10:00 – 12:30 **Registrace**

13:00 – 13:15 **Zahájení**

13:15 – 14:00 **Úvodní sdělení**

RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D.

Čtvrtstoletí identifikační genetiky – možnosti, přednosti, úskalí a neřešené problémy

14:00 – 15:00 **Analýza humánního genomu I.**

Dvořáková M. a spol. 20 minut
Molekulárně biologická diagnostika pacientů s podezřením na Bealsův syndrom

Roubalová L. a spol. 20 minut
Screening kolorektálního karcinomu u pacientů s diabetes mellitus typ 2 a bez diabetu, založený na detekci metylace SEPTINU 9 z plazmy

Bóday Á. a spol. 20 minut
Sledování metylačních změn u karcinomu kolorekta

15:00 – 15:15 **Přestávka**

15:15 – 16:45 **Analýza humánního genomu II.**

Dendis M. a spol. 20 minut
Farmakogenetika warfarinu - pouze genotypizace nestačí

Bonczek O. a spol. 20 minut
Vztah mezi mutacemi v genech pro MSX1 a PAX9 a agenezemi zubů v české populaci

Libra A. a spol. 20 minut
Predikce vývoje chronické lymfocytární leukemie (CLL) s využitím metody real-time PCR

Mgr. Ondřej Scheinost 30 minut
Trendy v analýze humánního genomu – Quo vadis ...

16:45 – 17:00 **Přestávka**

17:00 – 18:30 Panelová diskuse

Technologické a metodické pokroky v molekulární biologii

moderuje Ing. František Šturm, Ph.D., MeDiLa Pardubice

31. ledna 2013 čtvrtek

8:30 – 9:45 Péče o ženu

Trtková J. a spol. 15 minut
Možnosti neinvazivního prenatalního testování chromozomálních aberací v ČR a SR

Kašpírková J. a spol. 15 minut
Možnosti molekulárně biologického testování z cytologie z tekutého media - naše zkušenosti

Vargová L. a spol. 15 minut
Detekce bakterií způsobujících močové infekce – využití metody Real-Time PCR

Geleneky M. 30 minut
Toxoplasmóza – diagnostická specifika pohledem klinika

9:45 – 10:00 Přestávka

10:00 – 11:00 Problematika zoonóz

Slaný M. a spol. 15 minut
Molekulární analýza lidských izolátů patřících do komplexu *Mycobacterium avium*, získaných v letech 2003 – 2010

Kaevska M. a spol. 15 minut
Dohledávání zdroje mykobakteriální infekce u lidí pomocí real-time PCR

Bonczek O. a spol. 15 minut
Identifikace a výskyt rodu *Borrelia* na území České republiky

Vašíčková P. a spol. 15 minut
Alimentární viry v potravinovém řetězci drobného ovoce: identifikace kritických bodů a metody detekce

11:00 – 11:30 Přestávka

11:30 – 12:30 Varia

Kuchta T. a spol. 15 minut
Skúsenosti s využitím molekulárno-biologických metód při sledovaní kontaminácie potravinářských výrob

Hložek P. a spol. 15 minut
Citlivá a přesná diagnostika v molekulární mikrobiologii, aneb jak neprohrát boj s variabilitou patogenů

Krůtová M. a spol. 15 minut
Víc než jen čísla - ribotypizace izolátů *C. difficile*

Vohánka J. 15 minut
Jak snadno zpracovat NGS data aneb jak data z GS Juniora zapadají do diagnostiky.

12:30 – 13:00 Posterová sekce

Tavandzis S. a spol.
Praktické využití predikčních programů při stanovení patogenity variant nejasného významu u karcinomu prsu

Mikel P. a spol.
Externí a interní kontroly při detekci RNA virů

Mosio P. a spol.
Průkaz streptokoků skupiny G animální a humánní provenience metodou polymerázové řetězové reakce

Králík P. a spol.
Rutinní detekce a kvantifikace původce paratuberkulózy: validace a kruhové testy

13:00 – 13:30 Diskuse, závěr

RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D.

Forenzní DNA servis, s.r.o.
Bulovka 1606/1
180 00 Praha 8

tel.: +420 233 931 123
e-mail: daniel.vanek@DNA.com.cz

Čtvrtstoletí identifikační genetiky – možnosti, přednosti, úskalí a neřešené problémy

Vaněk D.

Před 25-ti roky, v roce 1987, byl na základě identifikační analýzy DNA dopaden a usvědčen historicky první pachatel trestné činnosti.

Přednášející seznámí posluchače s molekulárně-biologickými technikami používanými ve forenzní genetice za posledních 25 let a zodpoví otázky: Jaké jsou možnosti a meze identifikační genetiky? Co může ovlivnit správnost výsledků? Lze spáchat dokonalý zločin? Lze zfalšovat či zamaskovat biologické stopy na místě činu? Jak se „vracejí jména starým kostem“? Proč potřebujeme zákon o DNA? K čemu jsou dobré identifikační DNA databáze? Co je Innocence project?

Mgr. Magdalena Dvořáková

P&R LAB a.s.
Laboratoř molekulární biologie
Revoluční č. 2214/35
741 01 Nový Jičín

tel: +420 556 416 231
e-mail: magdalena.dvorakova@pr-lab.cz

Molekulárně biologická diagnostika pacientů s podezřením na Bealsův syndrom

Dvořáková M.¹, Cibulková P.¹, Všetická J.², Křenková R.¹, Jalůvková E.¹, Janýšková H.¹, Indráková J.¹

¹ Laboratoř molekulární biologie, P&R LAB a. s., Nový Jičín

² Genetická ambulance, Ostrava

Beals syndrom (Congenital contractural arachnodactyly) je dědičné autozomálně dominantní onemocnění pojivové tkáně. Klinické příznaky jsou velmi podobné Marfanovu syndromu, se kterým je často zaměňován, a proto je z tohoto důvodu těžké stanovit prevalenci onemocnění. Hlavními charakteristickými znaky jsou kloubní kontraktury (lokty, kolena, prsty na ruce), arachnodaktylie, svalová hypoplázie, osteopenie, skolióza, někdy kyfoskolióza, vpáčený či vypouklý hrudník a atypicky deformované ušní boltce. Kardiovaskulární a oční komplikace nejsou na rozdíl od Marfanova syndromu příliš typické.

Příčinou Beals syndromu jsou mutace v genu FBN2, který leží na dlouhém raménku 5. chromozómu (5q23). Produktem genu FBN2 je glykoprotein fibrillin-2, který pravděpodobně reguluje během časně embryogeneze tvorbu elastických vláken pojivových tkání.

Analýza exonů 22 až 36 genu FBN2 byla provedena u čtyř členné rodiny (rodiče a 2 děti) se suspektním Beals syndromem.

DNA byla izolována z periferní krve a k analýze byla pro separaci PCR produktů použita metoda SSCP (single strand conformation polymorphism) a heteroduplexová analýza (2100 Bioanalyzer, Agilent). Exony s odlišným migračním vzorem a elektroforegramovou křivkou byly následně sekvenovány.

Byly nalezeny 3 sekvenční změny. Ve dvou případech se jedná o intronové změny, z nichž jedna je v literatuře popisována jako polymorfismus a u druhé nelze v současné době jednoznačně stanovit míru patogenity, ale vzhledem k jejímu umístění mimo sestřihovou oblast (splicing) se domníváme, že nemá patogenní charakter. Třetí změnou je missense mutace p.Val965Ile, která je v literatuře popisována jako polymorfismus.

U této rodiny nebyla potvrzena přítomnost kauzální mutace způsobující Beals syndrom na molekulární úrovni v naší analyzované oblasti genu FBN2. S ohledem na literární zdroje, které uvádějí výskyt kauzálních mutací i v dalších exonech, uvažujeme o rozšíření analýzy o tyto exony.

Mgr. Lucie Roubalová

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

tel: +420 588 444 244
e-mail: lucie.roubalova@fnol.cz

Screening kolorektálního karcinomu u pacientů s diabetes mellitus typ 2 a bez diabetu, založený na detekci metylace SEPTINU 9 z plazmy

Roubalová L.¹, Sychra P.², Procházka V.², Novotný D.¹, Bartková M.¹

¹ Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc,

² II. interní klinika, Fakultní nemocnice Olomouc

SEPTIN 9 je protein, který se fyziologicky uplatňuje během cytokineze a zároveň plní úlohu nádorového supresoru. V celé řadě studií bylo prokázáno, že hypermetylace v úseku V2 genu pro SEPTIN 9 může být použita jako biomarker pro detekci všech stádií kolorektálního karcinomu. V naší studii jsme se zaměřili na porovnání výsledků tohoto testu u pacientů s diabetes mellitus typ 2 a pacientů bez diabetu. Bylo prokázáno, že diabetes mellitus typ 2 je rizikovým faktorem pro vznik kolorektálního karcinomu. Nádorová progresse je zde mnohem rychlejší a mortalita spojená s nádorovým procesem je zvýšená. Předpokládá se, že vyšší hladiny inzulinu a volného IGF-1 stimulují proliferaci buněk rekta, a tím zvyšují pravděpodobnost jejich transformace v nádorové buňky. Materiál: Vzorky plazmy byly získány od pacientů po provedené kolonoskopii. Na základě nálezu byli pacienti rozděleni do skupin (pacienti s diabetes mellitus typ 2/pacienti bez diabetes) bez nálezu, (pacienti s diabetes mellitus typ 2/pacienti bez diabetes) s nálezem adenomu a (pacienti s diabetes mellitus typ 2/pacienti bez diabetes) s nálezem karcinomu.

Metoda: Izolace DNA a bisulfitická konverze byla provedena kitem Epi proColon 2.0 (Epi proColon Plasma Quich kit). Následně byla provedena kvalitativní analýza metodou real time PCR na analyzátoru CFX 96 firmy Bio-Rad kitem Epi proColon 2.0 (Epi pro Colon Sensitive PCR kit) .

V přednášce budou prezentovány výsledky pilotní studie, které budou následně komentovány a hodnoceny z hlediska možného diagnostického využití,

Ing. Arpád Bóday

P&R LAB a.s.
Laboratoř molekulární biologie
Revoluční č. 2214/35
741 01 Nový Jičín

tel.: +420 556 416 233
e-mail: arpad.boday@pr-lab.cz

Sledování metylačních změn u karcinomu kolorekta

Bóday Á.¹, Tavandzis S.¹, Horká K.¹, Vaníčková P.¹, Čáň J.¹, Sýkora M.¹, Dvořáková H.¹,
Hodslavská v.¹, Kasperčík I.², Škrovina M.³, Gruna J.⁴

¹ Laboratoř molekulární biologie, P&R LAB a.s., Nový Jičín

² Laboratoř biotická a cytologická, P&R LAB a.s., Nový Jičín

³ Chirurgické oddělení, Nemocnice Nový Jičín a.s., Komplexní onkologické centrum, Nový Jičín

⁴ Onkologické oddělení, Nemocnice Nový Jičín a.s., Komplexní onkologické centrum, Nový Jičín

Kolorektální karcinom (CRC) je zařazen mezi civilizační choroby a v České republice patří mezi nejčastější nádorová onemocnění.

Vznik CRC je výsledkem akumulace rozdílných genetických a epigenetických změn, postihující epiteliální buňku. Tento postupný proces je charakterizován inaktivací tumorsupresorů, aktivací protoonkogenů, deficiencí „mismatch repair“ genů a zásahem do dalších genů prostřednictvím mutací, ztrát alel, hypermetylací, microRNA atd. Výsledkem je nekontrolovatelné dělení buněk s vysokou invazivitou a zakládáním metastáz.

Cílem této práce je sledování metylačního statusu genů *MLH1*, *APC*, *p16*, *TP53*, *MGMT* a lokusů *MINT1* a *MINT2*.

Jedná se o pilotní studie zahrnující 100 pacientů s CRC. DNA byla izolována z mražené nádorové tkáně (Fuji) a následně konvertována bisulfitovou metodou (Epigentek). Amplifikace byla provedena klasicky a/nebo v reálném čase za použití specifických primerů a hydrolizačních sond. Separace klasicky amplifikovaných PCR produktů proběhla v agarózovém gelu a na DNA čípech (Agilent).

V analyzovaném souboru byla detekována hypermetylace v genu *APC* - 33/100 (33%), *MLH1* - 15/100 (15%), *p53* - 11/100 (11%), *p16* - 22/100 (22%), *MGMT* - 36/100 (36%), *MINT1* - 21/100 (21%), *MINT2* - 28/100 (28%).

Výsledky metylačních analýz jsou dále hodnoceny spolu s mikrosatelitovou instabilitou, ztrátou heterozygoty a přítomností mutací v genech *K-ras*, *BRAF*, *EGFR* a *PIK3CA* a jsou korelovány s histologickými nálezy. Získané údaje umožňují molekulární subtypizaci CRC a výběr odpovídajícího konkrétního molekulárního markeru ke sledování progresu onemocnění a odpovědi na terapii.

RNDr. Miloš Dendis

GeneProof a.s.
Viniční 235
615 00 Brno

tel./fax: +420 543 211 679
e-mail: dendis@geneproof.com

Farmakogenetika warfarinu - pouze genotypizace nestačí

Dendis M.¹, Tomek A.², Maťoška V.², Horváth R.¹

¹GeneProof a.s., Brno

²Nemocnice Na Homolce, Praha

Warfarin je celosvětově nejpoužívanějším antikoagulačním léčivem, tj. lékem snižujícím srážlivost krve. Warfarin je nejčastěji indikován u pacientů s hlubokou žilní trombózou, plicní embolií, fibrilací nebo flutterem srdečních síní a pacientů po chirurgických výkonech v cévním řečišti. V ČR je odhadem léčeno warfarinem až 100 000 osob ročně.

Warfarin je ale také jedním z nejnebezpečnějších léčiv pro možné závažné krvácivé komplikace, které nezdědka působí smrt pacienta (až 2,9% všech léčených pacientů). Riziko závažných krvácivých komplikací se pohybuje zhruba od 10 do 16%. Mezi pacienty hospitalizovanými pro nežádoucí účinky léčby je právě warfarin celosvětově druhou nejčastější příčinou hned za inzulinem.

Hlavní příčinou nežádoucích účinků při léčbě warfarinem je jeho nízký terapeutický index a zároveň značná interindividuální variabilita dávky léku. Velikost dávky je závislá na zevních faktorech (tělesné hmotnosti, stravě, interakce s dalšími léky) a na genetické dispozici. Právě individuální genetická výbava je příčinou výrazné interindividuální variability v dávkování warfarinu. Dosud bylo možné tohoto dosáhnout jen empiricky („metodou pokus a omyl“) opakovaným měřením mezinárodního normalizovaného poměru (INR) protrombinového času s nutností častých krevních náběrů a následných korekcí podávané dávky.

V současnosti je však možné využít genetického testování, které umožňuje určit dávku warfarinu na základě genetické výbavy daného jedince. Právě farmakogenetika, která zkoumá vliv na podaný lék, nabízí možnost, jak s warfarinem léčit bezpečněji.

Individuální genetická výbava vysvětluje 45 – 60% interindividuální variability v dávkování warfarinu. Zásadní vliv je přisuzován dvěma genům: CYP2C9 pro biotransformační enzym cytochromu P450 CYP2C9 a genu VKORC1 pro cílový enzym blokováný warfarinem - podjednotky 1 enzymového komplexu vitamín K-epoxidreduktázy.

Pokusy o vytvoření exaktních pravidel při nasazování a vedení terapie warfarinem jsou staršího data. Korekce faktory jako je věk pacienta či jeho tělesná hmotnost a výška však nemohly být příliš úspěšné, negenetické vlivy mohou vysvětlit jen asi 30-40% variability denní dávky warfarinu. Po spojení negenetických a genetických vlivů do jednoho výpočtu můžeme dosáhnout významně vyšší přesnosti v odhadu denní dávky warfarinu, která dosahuje hodnotu koeficientu determinace (R^2) 79%.

Práce byla prováděna za podpory MPO ČR projektu č. FR-TI1/399 - Vývoj farmakogenetického diagnostického kitu pro určení dávky warfarinu

Mgr. Ing. Ondřej Bonczek

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Kotlářská 2,
611 37 Brno

tel: +420 495 549 496 817
e-mail: bonczek@mail.muni.cz

Vztah mezi mutacemi v genech pro MSX1 a PAX9 a agenezemi zubů v české populaci

Bonczek O.¹, Krejčí P.², Lochman J.¹, Šerý O.^{1,3}, Štembírek J.³, Černochová P.⁴, Vaněk J.⁴, Míšek I.³

¹ Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno,

² Klinika zubního lékařství, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc

³ Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd ČR, v.v.i., Brno

⁴ Stomatologická klinika, Fakultní nemocnice u Svaté Anny v Brně

Snížený počet zubů (hypodoncie) je nejčastější dědičnou poruchou lidské dentice. Vývoj zubu (odontogeneze) je velmi komplikovaný a komplexní proces, který zahrnuje souhru mezi ústním epitelem a buňkami přiléhajícího mezenchymu, které vycestovaly z neurální lišty. Tyto reciproké interakce jsou zprostředkovány více než 300 signálními molekulami, zahrnující Pax9, Msx1 a Axin2. Mutace v genech pro tyto tři regulační proteiny byly asociovány s izolovanou (nesyndromickou) formou hypodoncie. Msx1 (člen rodiny genů muscle segment homeobox) je transkripční represor, který obsahuje DNA-vázající homeodoménu, jež je schopna interagovat s ostatními členy transkripčního komplexu, včetně Pax9 (paired box 9). Jejich exprese byla identifikována pouze v dentálním mezenchymu. Cílem této práce bylo studium mutací exonových sekvencí genů pro MSX1 a PAX9.

DNA pacientů byla izolována z krve nebo buňkách stěrů pomocí UltraClean BloodSpin DNA izolačního kitu (Mo-Bio) od více než 200 českých pacientů s různými typy agenezí zubů. Produkty PCR pro exony genu pro MSX1 byly připraveny pomocí modifikované polymerázy Kapa 2G Robust Hot Start (Kapa Biosystems) vzhledem k vysokému podílu GC oblastí v DNA sekvenci. Amplikony byly sekvenovány pomocí genetického analyzátoru ABI 3130 Prism (Life Technologies). Výsledné sekvence byly porovnány se standardními sekvencemi a mutace byly popsány z hlediska jejich možného vlivu na proteinovou strukturu.

Byl identifikován nový polymorfismus v genu pro MSX1, který způsobuje záměnu aminokyseliny Ala40Gly. Jak jsme v naší studii zjistili, tento polymorfismus se objevuje jak u osob s hypodencií, tak u kontrolních osob s plnou denticí. Dále byly nalezeny intronové polymorfizmy a exonové polymorfizmy a to jak v genu pro MSX1, tak PAX9, které nezpůsobují aminokyselinové záměny. Tyto změny v nukleotidové sekvenci nemají přímý vliv na proteinovou strukturu, ale mohou mít vliv na stabilitu a regulaci genové exprese. Další výzkum bude zaměřen na rodinné studie ve vztahu k polymorfismům v genech pro MSX1 a PAX9 a agenezím zubů (resp. hypodoncie, oligodoncie) a na analýzu dalších genů pro proteiny zapojené do odontogeneze, např. AXIN2.

Projekt je podporován grantem IGA MZČR reg. č.: NT/11420 – 6/2010

PharmDr. Antonín Libra, Ph.D.

GENERI BIOTECH s.r.o.
Machkova 587
500 11 Hradec Králové

tel: +420 495 056 151
e-mail: antonin.libra@generi-biotech.com

Predikce vývoje chronické lymfocytární leukémie (CLL) s využitím metody real-time PCR

Libra, A.¹, Jurčíčková, Z.¹, Bunček, M.¹, Mádrová, H.², Plevová, K.^{2,3}, Tichý, B.², Pospíšilová, Š.², Bryja, V.³

¹ GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové

² Masarykova Univerzita, CEITEC, Brno

³ Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastějším leukemickým onemocněním v Evropě a Severní Americe. Prognóza onemocnění je hodnocena podle mutačního statusu genu pro variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu *IGHV*, přičemž prognóza je příznivější u pacientů s mutovaným *IGHV*.

S tímto zařazením velmi významně koreluje exprese čtyř genových biomarkerů v B-lymfocytech. Ve spolupráci GENERI BIOTECH a Masarykovy Univerzity v Brně byl vyvinut prognostický kit CLL založený na reverzně transkriptázové real-time PCR. Experimentálně byla ověřena prognostická účinnost jednotlivých genů i jejich kombinace. Souprava byla hodnocena na 118 pacientech a výsledek korelován s mutačním statutem *IGHV* pacientů. Výsledkem byla 100% specifita a 90% senzitivita.

Dále byl hodnocen vliv zpracování periferní krve na normalizovanou expresi prediktivních genů. Periferní krev byla zpracována třemi různými způsoby (osmolýza, gradientová centrifugace, gradientová centrifugace s deplecí T-lymfocytů).

Výzkum byl finančně podpořen grantem MPO FR-TI2/254

generi biotech

Mgr. Ondřej Scheinost

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

tel.: +420 387 873 010
e-mail: osche@nemcb.cz

TRENDY V ANALÝZE HUMÁNNÍHO GENOMU – *Quo vadis...*

Scheinost O.

Úvod: Oblast analýzy lidského genomu patří v posledních letech k extrémně se rozvíjejícím oborům, včetně patřičné mediální pozornosti. Užitečných klinických výstupů je však méně, než se očekávalo. Již dnes se zcela změnila koncepce tohoto oboru – novými metodickými postupy, nutnost změnit diagnostický přístup „laboratorní“ na „informatický“ a v neposlední řadě nás recentní výsledky nutí změnit i pohled na příčiny a charakteristiku dědičných onemocnění (vlastností).

Nové metody: Diagnostika se přesunuje od testování jednotlivých lokusů k celogenomovým přístupům, ať se jedná o skutečné celogenomové sekvenování, sekvenování exomu nebo genotypování na čípech (SNP arrays). Stále častější používání těchto nových metod je způsobeno i jejich klesající cenou, dnes již méně než 1000 USD za genom.

Bioinformatika: Nové metody produkující ohromné množství dat nastolují nerudovskou otázku: Co s nimi? V následujících letech nás tedy čeká problém způsobený absolutním nedostatkem odborníků na práci s těmito daty, přičemž již současné zkušenosti ukazují, že cena takové analýzy bude z většiny tvořena právě cenou práce bioinformatiků.

Změna pohledu na lidský genom: Nejnovější poznatky ukazují na zatím netušenou plasticitu lidského genomu. S překvapením zjišťujeme, že u „zdravých“ dospělých osob nalézáme kombinace, o kterých jsme si ještě nedávno mysleli, že jsou jednoznačně patologické a vedou k postižení. Tato skutečnost vyústí do nové definice mnoha chorob a k rozšíření znalostí o konkrétních modifikujících genech (vysoce polygenní znaky).

Závěr: Dnes je prakticky nemožné konkrétně odpovědět na otázku „Quo vadis, genetiko?“ – snad jen obecně a šalamounsky: „Někam jinam!“

Ing. Jitka Trtková, Ph.D.

IMALAB s.r.o.
U Lomu 638
760 01 Zlín

tel.: +420 577 001 637
e-mail: trtkova@imalab.cz

Možnosti neinvazivního prenatalního testování chromozomálních aberací v ČR a SR

Trtková J., Loucký J., Zemánek M.

IMALAB s.r.o., Zlín

Současné možnosti prenatalního screeningu umožňují vyšší než 90% záchyt nejčastějších chromozomálních aberací. Bohužel u současných screeningových metod je relativně velká část těhotných žen označena jako pozitivní a zpravidla poté absolvuje některou z invazivních procedur, za účelem získání buněk plodu a následně provedení jejich genetické analýzy. Tyto invazivní metody sebou nesou riziko fetální ztráty a jsou pro těhotné subjektivně nepříjemnou zkušeností. V roce 1997 byla publikována práce prof. Lo (1), která poprvé popsala výskyt fetální volné DNA v krevním oběhu matky. Díky tomuto objevu bylo v následujících letech vyvinuto velké úsilí mnoha vědeckých týmů, aby bylo možno tohoto faktu využít pro přímou detekci genetické výbavy plodu prostřednictvím jednoduše realizovatelného odběru krve matky. Fragmenty fetální volné DNA jsou v krevním oběhu matky detekovatelné zhruba od 4. týdne těhotenství, jejich zastoupení v poměru k volné mateřské DNA je zhruba 10 % (2) a doba přetrvávání v mateřské cirkulaci je kolem 24 h. Od roku 2008 se laboratoře lékařské genetiky Imalab s.r.o. spolu s Centrem prenatalní diagnostiky Prediko s.r.o. zapojily do mezinárodní klinické validační studie v oblasti využití fetálních nukleových kyselin v prenatalní diagnostice, tzv. InFANet Study. Výzkum byl veden dr. Canickem a dr. Palomakim z laboratoří medicínského screeningu a speciálního testování ve Women & Infants Hospital, Providence, Rhode Island, USA a zapojilo se do něj 27 center z celého světa. Těhotným ženám, podstupujícím na základě vysokého rizika aneuploidie plodu invazivní výkon (CVS či AMC), byla nabídnuta účast ve studii. Na základě informovaného souhlasu byla pacientkám odebrána periferní krev. V laboratoři byla následně zpracována plazma, hluboce zamražena a zaslána k analýze do Woman and Infants Hospital v Providence. Získané výsledky ve studii InFANet (3) byly na sklonku roku 2011 využity při uvedení prvního komerčního testu Downova syndromu (MaterniT21™) americké společnosti Sequenom, založeného na detekci volných nukleových kyselin do praxe. V únoru 2012 byl tento test doplněn o detekci trizomie chromozomů 13 a 18 (4, MaterniT21™ PLUS). Princip tohoto testování vychází ze skutečnosti, že každý fragment volné DNA lze přiřadit ke konkrétnímu chromozomu. Pokud se zaměříme např. na chromozom 21 a nalezneme vyšší podíl fragmentů odpovídajících tomuto chromozomu, tak můžeme usuzovat, že se jedná o těhotenství s trizomií 21. chromozomu. Proces vyhodnocování je poměrně časově i ekonomicky náročný a v tomto ohledu jej nelze srovnávat s klasickými screeningovými postupy. V roce 2011 byly publikovány další práce, které prokázaly, že přítomnost volných fragmentů fetálních nukleových kyselin v krevním oběhu matky lze využít pro detekci nejčastějších chromozomálních aberací a vedly v březnu 2012 k uvolnění testu Verifi™ prenatal test americké společnosti Verinata Health. V červnu 2012 byl pak uveden na trh test Harmony™ prenatal test firmy Ariosa diagnostics. Výsledky všech těchto prací ukázaly, že metodou masivního paralelního sekvenování lze odhalit téměř 100 % hledaných chromozomálních aberací, přičemž počet nevyhodnotitelných vzorků je zanedbatelně nízký. Na druhé straně je třeba uvést, že tyto práce zahrnovaly testování vysoce rizikové populace a není zcela zřejmé, jaké výsledky by byly získány u běžné populace. Dále je nutné uvést, že kolem zapojení testu do screeningového programu aneuploidií plodu nepanuje jednoznačný konsenzus, na závazná stanoviska odborných společností se čeká.

Literatura:

1. Lo YM, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997; vol. 350, no. 9076: 485-487.
2. Ehrich M, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. Am J Obstet Gynecol 2011;204:205.e1-11.

3. Palomaki GE, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. *Genetics in Medicine*. 2011; vol. 13, no. 11: 913-920.
4. Palomaki GE, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genetics in Medicine*. 2012; vol. 14, no. 3: 296-305.

RNDr. Jana Kašpírková, Ph.D.

Bioptická laboratoř s.r.o.
Mikulášské nám. 4
326 00 Plzeň

tel: +420 737 220 433
e-mail: kaspirkova@medima.cz

Možnosti molekulárně biologického testování z cytologie z tekutého media - naše zkušenosti

Kašpírková J.¹, Gomolčáková B.¹, Kinkorová I.¹, Ondič O.¹, Zůchová M.¹, Vaňousová D.²

¹ Bioptická laboratoř s.r.o., Plzeň

² Dermatovenerologická klinika Nemocnice Na Bulovce, Praha

Cytologie z tekutého média (LBC) představuje alternativu ke konvenčnímu vyšetření nátěru (CP) a nabízí navíc v indikovaných případech možnost dalších vyšetření, zejména testu na přítomnost vysoce a nízké rizikových papilomavirů (HR-HPV a LR-HPV) či dalších sexuálně přenosných infekčních agens. Bioptická laboratoř již více než rok používá LBC ThinPrep pro účely screeningu karcinomu děložního hrdla a análního karcinomu, proto je sdělení tematicky rozděleno do dvou částí.

1. Detekce HR-HPV pomocí metodiky Hybrid Capture 2 (Digene/Qiagen) je nejčastěji používaná adjuvantní metoda pro účely screeningu karcinomu děložního hrdla. Nejčastější indikací detekce HR-HPV je přítomnost atypických dlaždicových či žlázových buněk v cytologickém stěru. Při pozitivním průkazu HR-HPV je vysoká pravděpodobnost dysplastického procesu na děložním hrdle a pacientka podstupuje biopsii či expertní kolposkopii k potvrzení diagnózy. Z důvodu výskytu falešně pozitivních HR-HPV nálezů daných přítomností vysoké nálože LR-HPV je doporučeno u stěru do odběrové zkumavky Digene dodržovat interpretační šedou zónu, kdy je vzorek retestován či hodnocen jako hraniční. Pro vzorky odebrané do LBC media podobné doporučení zatím není staveno. V naší pilotní studii byla u 25 vzorků, jejichž výsledné hodnoty HR-HPV testu se pohybovali v blízkosti hraniční zóny, provedena genotypizace pomocí PCR, reverzní hybridizace a sekvenování a výsledky byly interpretovány vzhledem k cytologickému nálezu, popř. anamnéze pacientky.

2. Recentní studie prokázaly u HIV pozitivních mužů mající sex s muži (MSM) vysoké riziko vzniku anální intraepiteliální neoplazie (AIN) a análního karcinomu, jež jsou etiologicky spojené s HPV infekcí. Zatím neexistují přesné guidelines týkající se screeningu AIN a análního karcinomu u této skupiny mužů, avšak cytologický nátěr doplněný o detekci HPV se zdá být užitečným nástrojem k včasnému odhalení dysplastických změn. V příspěvku prezentujeme naše dosavadní zkušenosti u 15 MSM mužů.

Mgr. Lýdia Vargová

Ústav biochemie
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Kotlářská 2
611 37 Brno

tel.: +420 549 496 817
e-mail: lydiavargova@mail.muni.cz

Detekce bakterií způsobujících močové infekce - využití metody Real-Time PCR

Vargová L., Lochman J. Šerý O.

Ústav biochemie, PřF. MU Brno

Diagnostika a léčba močových infekcí činí nemalé potíže. Močové infekce způsobené *Mycoplasma genitalium* / *hominis*, *Ureaplasma urealyticum* / *parvum* a *Chlamydia trachomatis* způsobují tzv. nespecifické uretritidy. *Neisseria gonorrhoea* je původcem kapavky. Všechny uvedené bakterie se přenášejí sexuálně. Největší prevalence pohlavně přenosných močových infekcí je u sexuálně aktivních mužů i žen ve věku od 15 do 25 let. Mezi základní příznaky patří časté nucení k močení, vaginální výtoky nebo výtoky z močové trubice, bolest a dysurie. Infekce mají také často asymptomatický průběh a nejsou-li řádně vyléčeny, mohou vést k závažným poruchám plodnosti. Možnými diagnostickými metodami jsou sérologická nebo kultivační vyšetření, jejichž senzitivita a spolehlivost nebyvají dostačující. Nejpřesnější metodou stanovení je DNA diagnostika, z níž se v poslední době používá především RealTime PCR metoda. Podle klinických studií PCR diagnostika umožňuje detekovat minimálně o 15 % více pozitivních případů než kultivační vyšetření. RealTime PCR detekci lze provádět z klinického materiálu jako je moč, vaginální a cervikální stěry, sperma nebo stěry z močové trubice.

V naší studii bylo analyzováno 96 vzorků moče od pohlavně aktivních vysokoškolských studentů. Bakteriální DNA byla izolována dle upraveného protokolu za pomoci komerčně dostupného izolačního kitu UltraClean BloodSpin DNA Isolation Kit (MoBio, USA). Pro RealTime PCR detekci byly využity diagnostické soupravy EliGene[®] Mycoplasma hom/gen LC, **EliGene[®] Ureaplasma LC**, **EliGene[®] Chlamydia trachomatis LC** a EliGene[®] Neisseria LC (ELISABETH PHARMACON, ČR).

Na souboru vzorků byla prokázána přítomnost bakteriálního původce *Chlamydia trachomatis* v jednom případě. DNA *Ureaplasma urealyticum/parvum* byla nalezena v 9 analyzovaných močích a *Neisseria gonorrhoea* byla detekována u jednoho vzorku. *Mycoplasma genitalium/hominis* nebyla v testovaném souboru vzorků nalezena. Na základě porovnání dat z dotazníku, lze potvrdit bezpříznakový průběh infekce u některých účastníků pozitivních na přítomnost *Chlamydia trachomatis* nebo *Ureaplasma urealyticum/parvum*.

Tato práce byla podporována grantovým projektem TIP MPO č. FR-TI1/478.

MUDr. Markéta Geleneky

Klinika infekčních, tropických a parazitárních nemocí
3. LFUK a Nemocnice Na Bulovce
Budínova 2
180 00 Praha 8 – Libeň

tel: +420 266 082 705
e-mail: marketa.geleneky@gmail.com

Toxoplasmóza – diagnostická specifika pohledem klinika

Geleneky M.

Toxoplasmóza je jedna z nejrozšířenějších zoonóz u nás. Ohrožuje převážně pacienty s těžkým imunodeficitem, gravidní pacientky a jejich plody, novorozence a pacienty s často recidivující oční formou infekce. Právě u těchto skupin pacientů je rychlá, kvalitní a dobře interpretovaná diagnostika jedinou možností, jak ovlivnit jinak často negativní prognózu onemocnění. K dispozici máme širokou škálu přímých (PCR DNA parazita, biologický pokus) i nepřímých metod (sérologie včetně avidity IgG a komparativního imunoblotu), doplněných metodami zobrazovacími, specializovanými klinickými vyšetřeními či možností terapeutického pokusu. V klinické praxi se bohužel často setkáváme se situací, kdy jsou výsledky provedených vyšetření nesprávně interpretovány, což může mít až fatální následky (např. bezdůvodné přerušení gravidity). Sdělení pojednává jednak o specifických situacích, vyžadujících zvláštní přístup při vyšetřování i hodnocení výsledků (vyšetření novorozenců, imunodeficitních pacientů, jiného materiálu než krve či vztah toxoplasmózy a autoimunitních onemocnění). V druhé části se pak věnuje nejčastějším atypickým nálezům, se kterými se můžeme v diagnostice toxoplasmózy setkat (nespecifická či falešná pozitivita protilátek, protrahovaně nízká avidita IgG, zbytkové protilátky v latentní fázi). Prezentace je doplněna kazuistikami.

RNDr. Michal Slaný, Ph.D.

Výzkumný Ústav Veterinárního Lékařství, v.v.i.
Hudcova 70
621 00 Brno

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

Molekulární analýza lidských izolátů patřících do komplexu *Mycobacterium avium* získaných v letech 2003-2010

Slaný M.¹, Slaná I.¹, Ulman V.², Kalakayová E.², Pavlík I.¹

¹ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

² Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Zástupci komplexu *Mycobacterium avium* (MAC) jsou hojně rozšířeni v životním prostředí, a byly také izolovány z mnoha ptáků a savců. MAC obsahuje dva zástupce *M. avium subsp. avium* (MAA) a *M. hominissuis* (MAH), kteří jsou po *M. tuberculosis* druhým nejčastějším původcem plicních infekcí. Za hlavní zdroj MAA jsou považováni domestikovaní ptáci, zatímco zdrojem MAH je především půda. Cílem této studie bylo zjistit výskyt IS901 (lokus specifický pro MAA) u mykobakteriálních kmenů izolovaných od lidských pacientů v Moravskoslezském kraji, kteří byly pomocí GenProbe identifikováni jako MAC.

V rámci studie bylo vyšetřeno 242 izolátů MAC izolovaných ze sputa 124 pacientů vyšetřených v letech 2003-2010. Pro podrobnou molekulární analýzu byla použita triplex qPCR založená na detekci IS901 a IS1245. Souběžně byla u IS901 a IS1245 negativních izolátů provedena sekvenční analýza (16S rRNA, ITS a hsp65)

Zástupci MAC jsou po *M. tuberculosis* druhou nejčastější příčinou plicních mykobakterióz. Nejčastějším zástupcem MAC způsobujícím plicní infekce bylo MAH (69 %). Tato skutečnost je v souladu s literárními zdroji. Nižší výskyt MAA (7 %) může být vysvětlen pouze příležitostným kontaktem člověka s nakaženými ptáky, zatímco expozice kontaminovanou zeminou nebo aerosoly je mnohem častější. Navíc, pouze minimum pacientů zahrnutých do studie hlásilo blízký kontakt s ptáky (holubi nebo slepice). Ostatní mykobakteriální druhy zjištěné v rámci analyzované skupiny byly: *M. intracellulare* (18 %) jehož hlavním zdrojem je voda a nově popsání zástupci MAC (6 %; *M. arosiense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. marseillense*).

Tato práce byla podpořena grantem č. MZE0002716202 od Ministerstva zemědělství a grantem AdmireVet č. CZ 1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01 z Ministerstva školství, mládeže a Tělovýchovy České republiky.

Ing. Marija Kaevska, Ph.D.

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

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

Dohledávání zdroje mykobakteriální infekce u lidí pomocí real time PCR

Kaevska M., Králík P., Pavlík I.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

Netuberkulózní mykobakterie (non tuberculous mycobacteria, NTM) nebo potenciálně patogenní mykobakterie (PPM), jsou skupina mykobakterií schopných vyvolávat onemocnění především u imunosuprimovaných jedinců. Nejčastější typy onemocnění způsobené PPM u lidí jsou plicní infekce, lymfadenitida, kožní léze a systémové infekce. Chronické plicní onemocnění je nejčastější klinické onemocnění způsobené zástupci komplexu *M. avium*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. xenopi*, *M. malmoense* a dalšími mykobakteriemi. Často zastoupené jsou také lymfadenitidy, které se vyskytují nejčastěji u dětí a nejvýznamnějšími původci jsou zástupci komplexu *M. avium*, *M. malmoense* a *M. scrofulaceum*. PPM se v přírodě vyskytují ubikvitárně. Nejvýznamnější zdroje infekce pro lidi jsou voda, půda a různé další složky prostředí.

Metody molekulární biologie jsou používány pro detekci mykobakterií z několika důvodů. Kromě rychlosti testů v porovnání s pomalým růstem mykobakterií *in vitro*, je také významná jejich větší citlivost. Na našem pracovišti byly vyvinuty metody izolace DNA a následná kvantitativní real time PCR (qPCR) pro detekci *M. a. avium*/*M. a. hominissuis*. Tento systém se používá rutinně pro stanovení přítomnosti *M. a. avium*/*M. a. hominissuis* v klinickém materiálu pacientů a také pro došetření zdroje infekce v jejím prostředí.

Metoda izolace mykobakteriální DNA z různých typů půdy a prostředí a klinického materiálu je založena na komerčně dostupných soupravách s několika modifikacemi protokolu. Triplexní semi-kompetitivní qPCR je založena na detekci specifických inzerčních sekvencí IS1245 (specifická pro *M. a. hominissuis* a *M. a. avium*) a IS901 (specifická pouze pro *M. a. avium*). Pro odlišení falešně negativních výsledků od skutečně negativních je v triplex qPCR vložena plazmidová interní amplifikační kontrola (mimic systém s primery pro IS1245).

Z případů vyšetřovaných v naší laboratoři bylo u dvou případů krční lymfadenitidy u dětí detekováno *M. a. hominissuis* a jako nejpravděpodobnější zdroj infekce byla určena komerční půda z květináčů v jejich domácnostech. U imunokompromitovaného pacienta byla pomocí qPCR prokázána infekce *M. a. avium* ve střevním traktu. *M. a. avium* bylo také nalezeno v prostředí infikovaných slepic, od kterých pacient konzumoval vejce.

Kromě rychlosti a větší citlivosti v porovnání s kultivací mykobakterií se ukázalo, že qPCR je vhodnou metodou na došetření možných zdrojů infekce, především při posuzování infekčního tlaku v prostředí zvířat a lidí.

Tato práce byla provedena s podporou grantů Ministerstva zemědělství ČR (výzkumný záměr MZE0002716202) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt AdmireVet č. CZ1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01).

Mgr. Ing. Ondřej Bonczek

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Kotlářská 2,
611 37 Brno

tel: +420 495 549 496 817
e-mail: bonczek@mail.muni.cz

Identifikace a výskyt rodu *Borrelia* na území České republiky

Bonczek O., Lochman J., Pešák L., Šerý O.

Borrelia burgdorferi sensu lato patří mezi gramnegativní spirochéty a je původcem vleklého, multisystémového onemocnění zvaného lymeská borelióza, jehož bezproblémová antibiotická léčba je značně závislá na včasné diagnostice a průkazu patogenu. Situaci komplikuje i dosavadní absence účinného očkování určeného pro humánní medicínu. Všeobecně uznávaným celosvětovým vektorem je klíště obecné (*Ixodes ricinus*) a jeho vývojové formy, není však vyloučen ani přenos jinými hematofágními členovci.

V naší studii, která probíhala od roku 2008 do října 2012, bylo analyzováno 944 vzorků, převážně klíšťat, na přítomnost *B. burgdorferi s. l.* Izolace DNA byla prováděna pomocí kitu UltraClean BloodSpin DNA (Mo-Bio). K identifikaci patogenu byla použita vysoce senzitivní souprava EliGene *Borrelia* LC (Elisabeth Pharmacon), která je schopna specificky detekovat DNA pro boréliový flagelin u 1-10 borélií v 5 µl klinického vzorku při využití RealTime PCR systému na přístrojích LightCycler 2,0, LightCycler 480, LightCycler Nano, RotorGene a dalších.

Celkem byla zaznamenána pozitivita u 23 % vzorků. Mezi nejvíce promořené kraje ČR se zařadil Jihočeský a Pardubický kraj. Z analýzy dat po jednotlivých měsících a letech vyšla relativně spolehlivá korelace s průměrnými teplotami ovzduší v ČR a promořeností klíšťat boréliemi. Potencionálně nejvyšší riziko nákazy se podle získaných dat vyskytuje v měsících duben až srpen. Z provedené sekvenční analýzy intergenové oblasti (IGS) pozitivních vzorků byla zjištěna největší přítomnost *B. afzelii*, následované *B. garinii* a dalšími druhy. Sekvenční analýza mj. potvrdila robustnost zvolené metody detekce a její možné použití pro včasnou diagnostiku a následnou vhodně zvolenou léčbu antibiotiky.

Práce byla podporována projektem MPOČR FR-TI1/478

Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.

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

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

Alimentární viry v potravinovém řetězci drobného ovoce: identifikace kritických bodů a metody detekce

Vašíčková P., Králík P., Pavlík I.

Velkou oblastí současného zájmu se stávají viry ve spojitosti s infekcemi způsobenými požitím kontaminovaných potravin. Výsledky nedávných studií z různých částí světa ukazují, že tyto infekce jsou velmi časté i přes opatření, která mají za cíl minimalizovat rizika zejména bakteriální kontaminace potravinových řetězců. Nefunkčnost dosavadních opatření je dána odlišnými vlastnostmi virů a bakterií. Tato fakta vedou ke snaze vytvořit právě taková opatření, která budou zaměřena nejen na bakteriální ale také na virové původce infekcí z potravin. O důležitosti oblasti virologie potravin svědčí i nedávné zahrnutí alimentárních virů do doporučení v rámci „potravinářského zákoníku“ (tzv. *Codex Alimentarius*).

Skupina alimentárních virů zahrnuje viry, které vyvolají infekci člověka po konzumaci potravin živočišného i rostlinného původu. Tyto viry se replikují v buňkách trávicího traktu a následně jsou ve vysokém množství šířeny exkrementy infikovaných jedinců. Za nejčastější původce alimentárních infekcí jsou považovány noroviry a virus hepatitidy A. Potraviny mají významnou roli také v přenosu rotavirů, viru hepatitidy E, astrovirů, Aichi viru, sapovirů, enterovirů, koronavirů, parvovirů a enterovirů. Na základě symptomů, které tyto viry mohou vyvolat, lze alimentární viry obecně rozdělit do tří skupin: původci gastroenteritid (např. noroviry), původci virových hepatitid (viry hepatitid A a E) a nejméně četná a častá skupina virů majících schopnost replikace ve střevě infikovaného jedince, ale vlastní onemocnění je způsobeno napadením jiných částí lidského těla (např. dětská obrna – napadení centrálního nervového systému poliovirem). Za zmínku stojí také zoonotický potenciál některých zástupců alimentárních virů (např. virus hepatitidy E).

Možnosti šíření těchto virů jsou řešeny na oddělení Bezpečnosti potravin a krmiv Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. (VÚVeL) v rámci národních i mezinárodních projektů. Z pohledu virologie potravin a prostředí jsou sledovány potraviny rostlinného i živočišného původu, přičemž vybrané potravinové řetězce jsou monitorovány od fáze produkce, přes zpracování, až po tržní síť. Cílem příspěvku je podat ucelené informace nejen o virologii potravin a metodikách, které jsou používány na našem oddělení k izolaci a průkazu alimentárních virů v různých typech vzorků (např. voda, stěry z rukou a drobné ovoce), ale také o výsledcích mezinárodní monitorovací studie zaměřené na potravinový řetězec drobného ovoce (jahody a maliny).

Tato práce byla provedena s podporou grantů Ministerstva zemědělství ČR (výzkumný záměr MZE0002716202), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt AdmireVet č. CZ1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01) a EU projektu VITAL (grant no. KBBE 213178).

RNDr. Tomáš Kuchta, CSc.

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

tel: +421 250 237 167

e-mail: kuchta@vup.sk

Skúsenosti s využitím molekulárno-biologických metód pri sledovaní kontaminácie potravinárskych výrob

Kuchta T., Rešková Z., Koreňová J.

Oddelenie mikrobiológie a molekulárnej biológie, Výskumný ústav potravinársky, Bratislava

Pri sledovaní mikrobiologickej hygieny v potravinárskych výrobných zariadeniach (najmä bryndziarne a menšie prevádzky spracúvajúce mäso) využívame v prípade izolácie stafylokokov a listérií molekulárno-biologické metódy na získanie doplňujúcich informácií o týchto baktériach. Používame 5'-nukleázovú polymerázovú reťazovú reakciu s priebežnou fluorometriou (real-time PCR so sondami typu TaqMan) na jednoznačné určenie druhov *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*. V prípade *Staph. aureus* sa ďalej zisťuje pomocou real-time PCR prítomnosť génov zodpovedajúcich za produkciu enterotoxínov (SEA, SEB, SEC, SED). Na ďalšiu bližšiu špecifikáciu izolátov využívame analýzu počtu viacerých tandemových opakovaní (multi-locus variable tandem repeat (VNTR) analysis, MLVA) a sekvenovanie viacerých lókusov (multi-locus sequence typing, MLST). V prípade MLVA sa používa multiplexná PCR a amplifikované produkty sa separujú elektroforézou na gélovej kolóne s použitím prístroja QIAxcel (Qiagen, Hilden, Nemecko). V prípade MLST sa amplifikuje 7 lókusov (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* a *yqiL*), produkty sa prečistia a sekvenujú. Kombinácia výsledkov vysokodiskriminatívnej poddruhovej typizácie umožňuje sledovať kolonizáciu výrob perzistentnou mikroflórou, identifikovať zdroje kontaminácie a regulovať sanitáciu.

RNDr. Pavel Hložek

GeneProof, a.s.
Viniční 235
615 00 Brno

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

Citlivá a přesná diagnostika v molekulární mikrobiologii, aneb jak neprohrát boj s variabilitou patogenů

Hložek P., Dendis M., Baryal A.

Žijeme v době, kdy molekulární mikrobiologie zaujímá své pevné místo ve schématu rychlé, přesné a spolehlivé diagnostiky závažných virových a bakteriálních onemocnění.

Tak jako v dobách masivního rozšíření klasické mikrobiologie jsme si velmi rychle osvojili poznatky a práci s molekulárně biologickými metodikami. A stejně jako tenkrát jsme výsledkům, které tyto metody dávají, začali téměř dogmaticky věřit.

Žijeme v době, kdy molekulárně mikrobiologické metody dávají rychlé, velmi přesné, ale občas zcela zavádějící výsledky!

Typickým příkladem z poslední doby mohou být falešně negativní výsledky detekce mutant *Chlamydia trachomatis* a *Neisseria gonorrhoeae* ve Švédsku a stále diskutovaná schopnost detekce rychle se vyvíjejících variant HIV (především pak jeho CRF forem). Diskutujme, jak zůstat při použití molekulárně mikrobiologických metod nadále spokojeni s jejich přesností a rychlostí, ale zároveň neztratit obezřetnost a zpětnou vazbu nad každým jednotlivým výsledkem, který nám tyto metody mohou dát.

Mgr. Marcela Krútová

2. lékařská fakulta UK a FN v Motole
Ústav lékařské mikrobiologie
DNA laboratoř Kliniky dětské neurologie
V Úvalu 84
150 06 Praha 5

tel.: +420 224 436 789, +420 732 532 499

e-mail: marcela.krutova@seznam.cz

Víc než jen čísla - ribotypizace izolátů *C. difficile*

Krútová M.^{1,2}, Nyč O.¹, Matějková J.¹, Šolarová M.¹, Nekvasilová H.¹

¹ Ústav lékařské mikrobiologie,

² DNA laboratoř Kliniky dětské neurologie - Univerzita Karlova v Praze - 2. lékařská fakulta a fakultní nemocnice v Motole

Úvod: *Clostridium difficile* je významným nozokomiálním patogenem současnosti. V ČR prozatím neexistuje jednotný systém surveillance. Na našem pracovišti jsme zavedli ribotypizaci izolátů *C. difficile* pomocí kapilární elektroforézy. Tato metoda je považována za evropský standard typizace této bakterie. V současné době je známo více jak 300 druhů PCR ribotypů. Ty se mohou lišit virulencí, jako schopností a spektrem produkce toxinů, tendencí ke sporulaci, zvýšené schopnosti adheze na sliznice (1). V Evropě je snaha co nejpřesněji zmapovat a včasné prokazovat výskyt epidemických, vysoce virulentních PCR ribotypů, zejména pak ribotypu 027, který je původcem epidemií na celém světě.

Metody: Extrakce DNA z bakteriální kultury *C. difficile* byla provedena pomocí Chelex 100 Resin (Bio-Rad). PCR ribotypizace je založena na amplifikaci ISR (Intergenic Spacer Region) mezi geny 16S a 23S rRNA pomocí fluorescenčně značených primerů. Následná fragmentační analýza probíhá na přístroji ABI Prism 310, Genetic Analyser (Applied Biosystems). Výsledný ribotyp je určován porovnáním elektronických dat s Webribo databází (2). Pozitivní kontroly (referenční ribotyp 027, 176), negativní kontrola jsou součástí každé testované série. Tato metoda neobsahuje interní kontrolu amplifikace. Naše laboratoř je zapojena do externího hodnocení kvality organizované ECDIS, Leiden.

Výsledky: Pro pilotní testování jsme použili soubor kmenů *C. difficile* z FN Motol a dalších mikrobiologických pracovišť v ČR izolovaných ze stolic hospitalizovaných pacientů s podezřením na CDI (*Clostridium difficile* infection) v roce 2012. Celkem bylo PCR ribotypizací vyšetřeno: 63 izolátů *C. difficile*. Ribotyp 176 byl určen u 38 vzorků (60,31%). Ostatní ribotypy byly zastoupeny takto 014 v 6 případech (9,52%), 017/0,17/1 ve třech případech (4,76%), AI-12 ve 2 případech (3,17%), AI-8/0 ve třech případech (4,76%). Následující ribotypy byly zastoupeny vždy po jednom vzorku a to 1, 3, 9, 12, 18, 23, 51, 446, 479. Dva ribotypy se neshodovaly s žádným ribotypizačním profilem, budou dále testovány. Hypervirulentní ribotyp 027 nebyl prozatím naším testováním zachycen.

Závěr: PCR ribotypizace s použitím kapilární elektroforézy vykazuje vyšší míru diskriminace než klasická elektroforéza na agarózovém gelu, kterou jsme prováděli na ÚLM v předchozích letech. Elektronický formát dat umožňuje snadnější mezilaboratorní porovnávání a sdílení výsledků. Tuto metodu považujeme za velmi přínosnou pro potřebu epidemiologického dozoru - kontroly výskytu a šíření *C. difficile* na našem území. Za optimální považujeme centralizaci příslušné metody s návazností na evropské referenční laboratoře, které se danou problematikou zabývají.

V našem pilotním souboru prevaluje ribotyp 176, který je pro svoje biologické vlastnosti velmi podobný právě hypervirulentnímu kmenu 027(3). Ribotyp 176 jsme zachytili ve všech s námi spolupracujících nemocničních zařízeních. Tato skutečnost poukazuje na nepříznivou epidemiologickou situaci v ČR a nutnost zavedení soustavné surveillance, stejně jako implementaci takových protiepidemických režimů, které se již osvědčily v prevenci klostridiových infekcí v jiných zemích.

Literatura:

1. DENÈVE; et al. New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. Int. J. Antimicrob. Agents, 2009, 33, Suppl 1:S248
2. INDRA, A.; et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. J. Clin. Microbiol., 2008, 57 (11), 1377–1382.
3. NYČ, O.; et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 176 in the Czech Republic and Poland. Lancet, 2011, 377, 1407–1028.

Ing. Jaroslav Vohánka, Ph.D.

Roche s.r.o.
Karlovo nám. 17
120 00 Praha 2

tel: +420 724 483 607
e-mail: jaroslav.vohanka@roche.com

Jak snadno zpracovat NGS data aneb jak data z GS Juniora zapadají do diagnostiky.

Vohánka J.

Roche s.r.o., Praha

S příchodem stolních sekvenátorů využívající next generation sequencing technologie se mnoho laboratoří, zvyklých na kapilární flowgramy a Fasta sekvence, muselo vyrovnat s novým výstupem ze sekvenátorů, které mnohdy překračují desítky tisíc sekvencí. Ačkoli toto číslo zní magicky, pro uživatele to neznamena, že musí procházet každou sekvencí zvlášť, ale spíše se jedná o změně pohledu na tato data. Jaké jsou možnosti v hodnocení NGS dat, jak jsou tato data přijímána mezi genetiky a jak vypadá bioinformatický výstup laboratoře pro kliniky? Kolik času analýza dat zabere a je nutný vystudovaný bioinformatik s IT infrastrukturou? V podání 454-Roche amplikonového sekvenování rozhodně ne.

P&R LAB a.s.
Laboratoř molekulární biologie
Revoluční č. 2214/35
741 01 Nový Jičín

tel.: +420 556 416 234
e-mail: spiros.tavandzis@pr-lab.cz

Praktické využití predikčních programů při stanovení patogenity variant nejasného významu u karcinomu prsu

Tavandzis S.¹, Krhutová V.¹, Kroupová P.¹, Kyselová K.², Macková J.¹, Jalůvková E.¹

¹ P&R LAB a.s., Laboratoř molekulární biologie, Nový Jičín

² Nemocnice Nový Jičín a.s., Ambulance klinické genetiky

Přesná interpretace sekvenčních variant je nezbytnou součástí genetických vyšetření. Počítačové programy založené na různých výpočetních algoritmech mohou s určitou pravděpodobností předpovědět míru patogenity variant nejasného významu. Jedny z nejčastěji používaných softwarů v klinické praxi jsou Align-GVGD, Panther, PolyPhen, SIFT, Pmut, BDGP- Splice Site Prediction, HumanSplicingFinder, Automated Splice-Site Analysis, MaxEntScan a další.

Toto sdělení stručně shrnuje současné možnosti, limity a osobní zkušenost s využitím predikčních softwarů v rutinní praxi v Laboratoři molekulární biologie P&R LAB a.s. v Novém Jičíně a zároveň uvádí konkrétní případ pacientky s karcinomem prsu s detekovanou variantou nejasného významu.

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

tel.: +420 533 331 622
e-mail: mikel@vri.cz

Externí a interní kontroly při detekci RNA virů

Mikel P., Vašíčková P., Králík P.

K detekci patogenních RNA virů se v současné době využívá moderních molekulárně-biologických přístupů. Nejpoužívanější metodou je tzv. kvantitativní reverzně transkripční real-time PCR (RT-qPCR) umožňující detekci a kvantifikaci RNA virů, zejména rodů *Lentivirus*, *Hepatovirus* a *Influenzavirus*. Ve srovnání s analýzou DNA je analýza RNA virů složitějším a citlivějším procesem, zejména z důvodu nutnosti reverzní transkripce virové RNA. Překážku rutinní analýze RNA virů pomocí RT-qPCR představuje především nedostatek spolehlivých RNA pozitivních kontrol a standardů, které by umožnily, přes izolaci, reverzní transkripci, amplifikaci, detekci a kvantifikaci, kontrolu všech kroků analýzy virové RNA.

Při použití RT-qPCR se jako interní RNA kontroly v analyzovaných vzorcích většinou využívají molekuly mRNA, které vznikají transkripcí z referenčních genů exprimovaných v relativně konstantním množství, či syntetické RNA konstrukty. Externí RNA kontroly jsou většinou přidávány k analyzovaným vzorkům zvlášť, před začátkem jejich analýzy. Při navrhování konstruktů sloužících jako externí RNA kontroly se využívají dvě odlišné strategie: kompetitivní a nekompetitivní. Kompetitivní kontroly využívají pro svou amplifikaci stejných primerů jako cílové virové sekvence, avšak také používají odlišné specifické hydrolyzační sondy. Tyto kontroly nejvíce napodobují amplifikaci cílové virové sekvence, ale jejich nevýhodou je, že snižují detekční schopnost RT-qPCR, a to zejména u vzorků obsahujících malou virovou nálož. Pro každý detekovaný virus je navíc třeba konstruovat samostatnou kompetitivní kontrolu, což je pro většinu běžných mikrobiologických laboratoří příliš náročné a neefektivní.

Naproti tomu nekompetitivní kontroly jsou konstruovány jako specifické sekvence naprosto odlišné od analyzované virové sekvence, a tedy nesnižující detekční schopnost RT-qPCR ani u vzorků s malou virovou náloží. Tím lze do značné míry zabránit falešně negativním výsledkům. Nevýhodou je, že amplifikace nekompetitivní kontroly nemusí vždy přesně odrazet amplifikaci analyzovaných virových sekvencí. Přesto výhody systémů nekompetitivní kontroly převyšují jejich nedostatky a jsou tedy vhodnější, než systémy založené na kompetitivních kontrolách.

Zejména kvůli přítomnosti potenciálních inhibitorů RT-qPCR nebo neefektivní izolaci virové RNA je nutné tyto kontrolní standardy používat. Největší problém analýzy RNA virů představují všudypřítomné RNázy, degradující nejen analyzovanou virovou RNA, ale i kontrolní standardy, a tedy zásadním způsobem ovlivňují validitu RT-qPCR výsledků. Řešením těchto problémů je využití technologie armored RNA (aRNA) pro konstrukci kontrol a standardů. Tato technologie je popsána a zavedena, ale její reálné využití je zatím spíše ojedinělé. Jejím cílem je zabalení specifické sekvence kontrolní RNA do fágových proteinů za vzniku pseudovirionových částic. Pseudovirionové částice nejenom chrání RNA v nich obsaženou před degradací RNázami, ale také napodobují analyzované virové částice, čímž dále zvyšují specifičnost detekční metody. Další významnou vlastností těchto částic je jejich neinfekčnost, dlouhodobá stabilita při uchovávání v různých podmínkách a neschopnost se replikovat.

V rámci pracovní skupiny Virologie potravin Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. se zabýváme vývojem pseudovirionových částic s využitím technologie aRNA, které budou sloužit jako externí nekompetitivní RNA kontroly pro detekci významných alimentárních RNA virů, zejména rodu Norovirus a čeledí Coronaviridae, Astroviridae, a Picornaviridae. Tyto viry jsou významnými patogeny u člověka i u zvířat a postihují především trávicí ústrojí. Až na výjimky jsou tyto patogenní viry v podmínkách in vitro nekultivovatelné. RT-qPCR tedy představuje jedinou vhodnou metodu pro jejich detekci a kvantifikaci. Tyto viry jsou v současné době

velmi podrobně studovány v rámci projektů 7. Rámcového programu EU, přičemž do některých z nich je zapojeno i naše pracoviště.

Tato práce byla provedena s podporou grantů Ministerstva zemědělství ČR (výzkumný záměr MZE0002716202), Ministerstva zdravotnictví ČR (NT13884-4/2012) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt AdmireVet č. CZ1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01).

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd
Studentská 573
532 10 Pardubice

tel.: +420 466 037 704
e-mail: Petra.Mosio@upce.cz

Průkaz streptokoků skupiny G animální a humánní provenience metodou polymerázové řetězové reakce

Mosio P., Sleha R., Kusáková E., Kukla R., Vydržalová M., Mazurová J.

Cílem bylo ověření a následné zavedení metody polymerázové řetězové reakce (PCR) k identifikaci streptokoků se skupinovým antigenem G (GGs). Výsledky byly srovnávány s identifikací GGs konvenčními metodami. Současně jsme metodou PCR prokazovali vybrané faktory virulence u *Streptococcus (Str.) canis* a *Str. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*.

Z vyšetřených 716 tampónových stěrů z různých anatomických lokalit psů a koček jsme vykultivovali 88 kmenů streptokoků. Na základě antigenní specifity a biochemické aktivity odpovídalo 87 kmenů *Str. canis* a 1 *Str. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*. Druhově specifickou PCR jsme identifikaci kmenů potvrdili.

Dále jsme vyšetřili 388 kmenů GGs izolovaných z různých klinických vzorků od lidí. Z tohoto souboru jsme konvenčními metodami určili 358 kmenů jako *Str. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, 25 *Str. canis* a 5 *Str. dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*. Druhově specifickou metodou PCR byla správnost výsledků všech kmenů *Str. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* potvrzena. Z 25 kmenů identifikovaných biochemickými testy jako *Str. canis*, jsme metodou PCR potvrdili pouze 8 kmenů, ostatní odpovídaly druhu *Str. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*. Kmeny určené konvenčními testy jako *Str. dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* byly metodou PCR všechny identifikovány jako *Str. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*.

Přítomnost genů kódujících streptolysin S, který je významným faktorem virulence v patogenezi nekrotizující fasciitidy, jsme metodou PCR potvrdili u všech kmenů testovaných streptokoků. Geny kódující streptokokový pyrogenní exotoxin G nebo streptokokový mitogenní exotoxin Z jsme neprokázali.

Práce byla realizována za podpory grantů SGFChT/2013.

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

tel.: +420-533331601
e-mail: kralik@vri.cz

Rutinní detekce a kvantifikace původce paratuberkulózy: validace a kruhové testy

Králík P., Pavlík I., Králová A., Slaná I.

V rutinní detekci původců onemocnění pomocí real time PCR (qPCR) je nutné provádět ve stanovených intervalech validaci metodik, aby byla ověřena stabilita deklarovaných parametrů (citlivost, robustnost, opakovatelnost apod.). Tyto testy jsou také nezbytným předpokladem získání akreditace. Validaci je možné provádět pomocí kalibrovaných standardů nebo kruhových testů. Výrobci diagnostických kitů pro klinickou diagnostiku nebo klinické laboratoře provádějící tuto diagnostiku mají k dispozici panely externích kontrol kvality, kdy za úplatu je možné získat analytické vzorky od certifikační autority (QCMD, Instand). Analýzou těchto vzorků získá dotýčný výrobce či laboratoř informace o parametrech svého qPCR systému.

Pro veterinární diagnostiku však takové možnosti neexistují nebo jsou velice omezené. Přestože významné veterinární patogeny, mezi které patří i původce paratuberkulózy, se často detekují pomocí PCR a qPCR, panely kontrol kvality nejsou k dispozici. Jednorázovým řešením je uspořádání kruhových testů v rámci projektu sdružujícím více laboratoří. Tato varianta je však relativně logisticky náročná. Nicméně naše laboratoř se zúčastnila dvou kruhových testů na detekci původce paratuberkulózy v mléce, sýrech a trusu.

V příspěvku budou shrnuty naše zkušenosti z kruhových testů a budoucí možnosti validace detekčních systémů pro původce paratuberkulózy.

Tato práce byla provedena s podporou grantů Ministerstva zemědělství ČR (výzkumný záměr MZE0002716202) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt AdmireVet č. CZ1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01).

GeneProof

Molecular diagnostics for your routine

Výzkum, vývoj a výroba   certifikovaných PCR souprav pro rutinní laboratorní diagnostiku

●●● Humánní mikrobiologická diagnostika
●●● Humánní genetická diagnostika
●●● Speciální diagnostika

●●● Real-time PCR
●●● End-point PCR

www.geneproof.com

GeneProof a.s. • Viniční 235 • 615 00 Brno



Roche Diagnostics je předním světovým výrobcem diagnostických systémů a poskytovatelem zdravotnických informací. Jsme zaměřeni na výzkum, vývoj, marketing a servis produktů a řešení nejenom pro laboratoře, lékaře a pacienty, ale také pro výzkum a průmysl.

Roche, s.r.o.
Diagnostická divize
Karlovo náměstí 17
120 00 Praha 2
<http://www.roche-diagnostics.cz>



<http://www.roche->



Skrínink rakoviny děložního čípku Ďábel se ukrývá v detailech

cobas® HPV Test pomáhá odhalit onemocnění, které není zachyceno cytologií

cobas® HPV Test je jediný klinicky validovaný test schválený FDA a s certifikací CE, který současně poskytuje sdružený výsledek vysoce rizikových genotypů a individuální výsledky nejvíce rizikových genotypů HPV16 a HPV18.

Studie ATHENA¹ na více než 47 000 ženách ukázala:

- Přibližně 1 z 10 žen, které byly pozitivně testovány cobas® HPV testem na genotypy 16 a 18, měla ve skutečnosti prekancerózu, ačkoli měla normální test Pap (ThinPrep test - LBC)².
- Přibližně 1 ze 3 žen, které měly hraniční cytologii nebo ASC-US (ThinPrep testem - LBC) a byly současně HPV16 pozitivní, měla již vysoký stupeň onemocnění děložního čípku, ve srovnání s pouze 1 ze 7 žen, které byly pozitivní na 12 ostatních hrHPV³.

cobas® HPV test poskytuje přesvědčivou identifikaci rizika rakoviny děložního čípku již při prvním vyšetření.

Více se můžete dovědět na www.hpv16and18.com nebo www.hpv16a18.cz

ATHENA - Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics. HPV = Human Papillomavirus.
1. This study enrolled over 47,000 women > 21 years of age, undergoing routine cervical cancer screening.
2. Wright T, et al. Am J Clin Pathol 2011; 136: 578-586.
3. Stoler MH, et al. Am J Clin Pathol 2011; 135:468-475.
© 2012 Roche Molecular Systems, Inc. All rights reserved. COBAS is a trademark of Roche.
Roche Molecular Diagnostics, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588 USA. <http://hpv16and18.com>



The cobas® HPV Test
KNOW THE RISK





BAG Health Care GmbH nabízí řadu PCR diagnostik: BAGene - SSP typizace červených krvinek, HISTO TYPE - SSP typizace HLA, HISTO SPOT® – SSO testy pro typizaci I. a II. HLA třídy včetně automatu MR. SPOT®. Nedílnou součástí nabídky jsou i kontrolní testy, např. CYCLER CHECK pro kontrolu teplotní uniformity termocyklérů či Wipe Test pro kontrolu HLA kontaminací.

Součástí naší nabídky jsou i speciální kity pro průkaz predispozice k chorobám asociovaných s určitými HLA typy – Celiakie, Narkolepsie, autoimunitní choroby asociované s B27.

O této, i další nabídce firmy naleznete více informací na našich webových stránkách, nebo přímo od našich prodejců.

BAG Health Care GmbH
Na Hlínách 555/17
182 00 Praha 8

Tel.: 286 840 508 Fax: 286 840 510
E-mail: info@bag-healthcare.cz
www.bag-healthcare.cz



Medisco Praha s.r.o

Dodavatel souprav pro molekulárně biologickou diagnostiku infekčních markerů a genových mutací metodami RT PCR a reverzní hybridizace a přístrojového vybavení pro PCR laboratoře.

Sídlo: U Zeměpisného ústavu 4, 160 00 Praha 6

Tel: 233 334 300, 233 334 339

Fax: 224 323 171

e-mail: medisco@medisco.cz
www.medisco.cz



One Partner. A Total Solution.

- FISH pro cytogenetiku, hematologii a patologii
- Kompletní automatizované řešení RT- PCR diagnostiky infekčních onemocnění (CMV, CT, HBV, HCV, HCV Genotype, HPV, HIV,...)

Pro více informací prosím kontaktujte:

BIOMEDICA ČS, s.r.o, Meteor Centre Office Park, Sokolovská 100 / 94, 186 00 Praha 8 – Karlín

Email: pavlina.kulilova@biomedica.cz, magda.navratilova@biomedica.cz,

tel: 602 324 661, 724 794 990.



ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Náměstí Svobody 18
602 00 Brno
Tel.: +420 542 213 851
Fax: +420 542 213 827
E-mail: info@elisabeth.cz
www.elisabeth.cz
IČ: 26258412, DIČ: CZ26258412



Společnost ELISABETH PHARMACON působí na trhu již jedenáctým rokem a je známa nejen jako distributor produktů v oblasti molekulární biologie a přístrojové techniky, ale především jako certifikovaný výrobce Real Time PCR diagnostiky EliGene. Soupravy jsou vyráběny a prodávány pod kontrolou systému kvality ISO 13485:2003 a ISO 9001:2008.



DYNEX LABORATORIES, s.r.o., Lidická 977, 273 43 Buštěhrad

Tel: 220 303 600, E-mail: office@dynex.cz , www.dynex.cz

- Dodavatel a výrobce laboratorních přístrojů, diagnostických souprav a spotřebního materiálu
- Kvalitní produkty pro klinické diagnostické laboratoře, akademie a výzkumné ústavy, pracoviště forenzní genetiky, veterinární a hygienické laboratoře, fytopatologii, laboratoře testující kvalitu a složení potravin a další
- Ucelený sortiment produktů pro Vaši laboratoř včetně odborného zaškolení obsluhujícího personálu a poradenství
- Profesionální zákaznický servis a komplexní řešení diagnostického procesu v rámci českého a slovenského trhu

Diagnostika

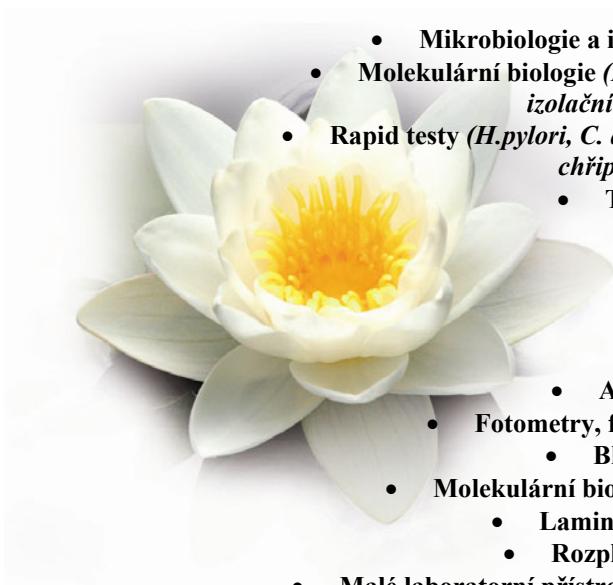
- Mikrobiologie a imunologie (*ELISA, imunofluorescence, bloty*)
- Molekulární biologie (*Real Time PCR i endpoint PCR, hybridizace, RFLP, izolační soupravy, obecné reagenty a pufry*)
- Rapid testy (*H.pylori, C. difficile, E.coli EHEC, O157, Campylobacter, Strep A, chřipka A/B, RSV, adenoviry, rotaviry*)
 - Testy na drogy ze slin a moče
 - Kultivační média
 - Imunohematologie
 - A další

Přístroje

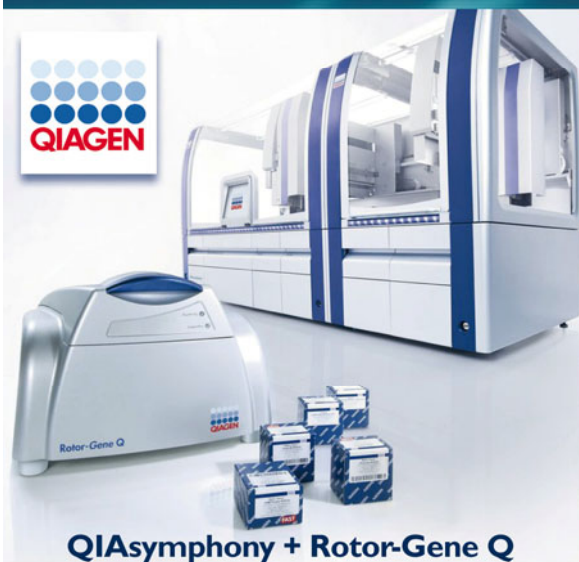
- Automaty (*DSX, DS2, Chorus*)
- Fotometry, fluorometry, luminometry, promývačky
 - Blotové techniky (*DYNABLOT*)
- Molekulární biologie (*termocyklery, ELFO, drobné přístroje*)
 - Laminární a biohazardní boxy, digestoře
 - Rozplňovací zařízení (*Qasar, Dynamic*)
- Malé laboratorní přístroje (*třepačky, míchadla, inkubátory, centrifugy, lázně*)
 - Pipety, dávkovače a plastový spotřební materiál

Zkušební a kalibrační laboratoř DYNEX akreditovaná ČIA

- Kalibrace pipet
- Zkoušky laminárních boxů



Automatizace s QIAGEN moderní cesta k úspěchu



QIASymphony + Rotor-Gene Q

Milník v automatickém zpracování vzorků v rutinní diagnostice.

Plně automatizovaný CE IVD certifikovaný proces od vzorku až k výsledkům.

- Izolace DNA, RNA, proteinů, až 1-96 vzorků, až 1000 µl vstupní objem vzorků; následuje automatické napipetování reakcí a detekce na přístroji Rotor-Gene Q
- artus transplantation panel (CMV, EBV, HSV, BK virus, and VZV)
- artus blood-borne virus panel (HIV, HCV, and HBV)
- In-house tests
- a další aplikace:
 - Other artus infectious disease assays
 - Women's health PCR assays (e.g., HPV, CT, and CT/NG)
 - theascreen molecular pathology panel (e.g., KRAS, EGFR, BRAF)
 - Expert user-developed tests



Pyromark – Pyrosequenční technologie



QIAgility – Pipetovací automat



QIAcube – Automat na kolonkové purifikační kity QIAGEN



EZ1 Advanced a EZ1 Adv.XL – Purifikační automaty



QIAxcel – Analýza fragmentů bez gelu



Rotor-Gene Q – qPCR-ideální pro multiplex a HRM



QIAextractor – Izolace NK úspěšně

Bio-Consult Laboratories spol. s r.o.,

Božejovická 145, 142 01 Praha 4 – Libuš

Tel./fax +420 244 471 239 • Tel./fax +420 241 729 792

www.bioconsult.cz

LAB MARK a.s.
Pod Cihelnou 23
161 00 Praha 6-Ruzyně



Tel.: +420 233 335 548
Fax: +420 224 311 830
Web: www.labmark.cz
E-mail: labmark@labmark.cz

M.G.P. spol. s r. o.
Kvítková 1575
Zlín 760 01
tel. +420 577 212 140
fax: +420 577 211 724
e-mail: mgp@mgp.cz
www.mgp.cz



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
Křížkova 68
612 00 Brno

Tel.: +420 549 121 205 (237, 238)
FAX: +420 541 243 390
E-mail: trade@testlinecd.com
Web: www.testlinecd.cz



BioVendor – Laboratorní medicína a.s.
Karásek 1/1767
621 33 Brno

Tel.: +420 549 124 111
FAX: +420 549 211 465
E-mail: info@biovendor.cz
Web: www.biovendor.cz



GeneTiCA s.r.o.
Služeb 4
108 00 Praha 10
tel.: +420 272 701 739
e-mail: genetica@genetica.cz
web: <http://www.genetica.cz>

Společnost LABOSERV s.r.o. se zabývá obchodní a poradenskou činností v oblasti laboratorní diagnostiky. Sortiment dodávaných produktů splňuje vysoké nároky na kvalitu a pokrývá diagnostiku především v laboratořích imunologického a mikrobiologického zaměření.

**Dodáváme PCR soupravy pro
end-point a real-time molekulární diagnostiku
od společnosti InterLabService.**

LABOSERV s.r.o.
Hudcova 532/78b
612 00 Brno
www.laboserv.cz
www.lshop.cz



OXOID CZ s.r.o.
Thermo Fisher Scientific
Kaštanová 539/64
Brno, Brněnské Ivanovice
620 00



ThermoFisher
S C I E N T I F I C

Objednávky a zákaznický servis

Tel: 800 101 038
Fax: +420 544 501 108
Email: oxoid.cz@thermofisher.com