



SBORNÍK

10. ročníku odborné konference

**RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI**

RANK 2014

29. a 30. ledna 2014, 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
Ing. Hana Skalická

Odborný garant konference:

Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

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

ISBN 80-86895-29-7

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

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko - technologická

ODBORNÁ KONFERENCE

RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI

RANK 2014

**29. a 30. ledna 2014
v prostorách hotelu Zlatá Štika, 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

**ROCHE s.r.o.
GeneProof a.s.**

Dalšími sponzory jsou společnosti

**ASCO-MED spol. s r. o.
Bio-Consult Laboratories spol. s r.o.
BioVendor – laboratorní medicína a.s.
ELISABETH PHARMACON spol. s r.o.
GENERI BIOTECH s.r.o.
LABOSERV s.r.o.
M.G.P. spol. s r.o.
Schoeller Pharma Praha s.r.o.**

**BAG Health Care GmbH
BIOMEDICA ČS s.r.o.
DYNEX LABORATORIES s. r.o.
GeneTiCA s.r.o.
LAB MARK a.s.
MEDISTA spol. s r.o.
PentaGen s.r.o.
SIPOCH spol. s r.o.**

PROGRAM

29. ledna 2014 **středa**

10:00 – 12:30 **Registrace**

13:00 – 13:15 **Zahájení**

13:15 – 14:00 **Úvodní sdělení**

Prof. RNDr. Václav Pačes, DrSc., Ústav molekulární genetiky AV ČR 45 min
Od Gregora Mendela k personalizované medicíně

14:00 – 15:20 **Analýza humánního genomu I.**

Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc., LF UK a FN Plzeň 30 min
Přehled postupů v diagnostice nádorových onemocnění molekulárně biologickými technikami

Doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D., ÚKBD, LF a FN Hradec Králové 20 min
Nestandardní nálezy v laboratorní dokumentaci a atypické výsledky vyšetření pomocí CE-IVD souprav určených pro analýzu lidské DNA

Mgr. Jana Sabová, synlab genetics s.r.o., Praha 20 min
Molekulární genetická diagnostika u vzácně se vyskytujících dědičných onemocnění

15:20 – 15:40 **Přestávka**

15:40 – 17:10 **Analýza humánního genomu II.**

Mgr. Ondřej Scheinost, Nemocnice České Budějovice a.s., Laboratoř molekulární biologie a genetiky 20 min

Screening karcinomu močového měchýře v selektovaných populacích - znovu a lépe

Ing. Jaroslav Vohánka, Ph.D., Roche, Praha 20 min
Je NGS technologie dostatečně zralá pro rutinní testování prediktivních onkomarkerů?

Mgr. Jiří Štika, synlab genetics s.r.o., Praha 20 min
Diagnostika autosomálně recesivní polycystické choroby ledvin pomocí NGS

MUDr. Soňa Fraňková, IKEM Praha 20 min
Význam vyšetření genotypu IL28B v léčbě HCV infekce

17:10 – 17:30 **Přestávka**

17:30 – 18:30 **Panelová diskuse**
Technologické a metodické pokroky v molekulární biologii

19:30 – 23:00 **Společenský večer**

30. ledna 2014 **čtvrtek**

8:30 – 9:30 **Využití molekulárně biologických postupů v infektologii I.**

Ing. Natalija Piskunova, CSc., Nemocnice České Budějovice a.s., Laboratoř molekulární biologie a genetiky 20 min
PCR diagnostika respiračních infekcí

RNDr. Jana Kašpírková, Ph.D., Bioptická laboratoř s.r.o., Plzeň 15 min
Molekulárně genetická detekce virových a bakteriálních patogenů pro diagnostiku infekční myokarditidy

	Mgr. Martina Sittová, GeneProof a.s., Brno	15 min
	Detekce bakteriální rezistence molekulárně-biologickými metodami. Budeme léčit geny?	
9:30 – 9:50	Přestávka	
9:50 – 10:50	<u>Využití molekulárně biologických postupů v infektologii II.</u>	
	Mgr. Marcela Krůtová, 2.lékařská fakulta UK a FN v Motole	15 min
	Clostridium difficile MLVA: metoda kontroly nozokomiálního přenosu	
	Mgr. Radka Kutová, ÚKBD, LF a FN Hradec Králové	15 min
	Vyšetření rezistence na antivirotika u CMV infekcí	
	RNDr. Pavel Hložek, GeneProof a.s., Brno	20 min
	Validace a verifikace molekulárně biologických metod v analýze humánního a extrahumánního genomu	
10:50 – 11:00	Přestávka	
11:00 – 11:40	<u>Posterová sekce</u>	
11:40 – 12:10	Přestávka	
12:10 – 13:20	<u>Aplikace v hygieně a veterinární medicíně</u>	
	RNDr. Tomáš Kuchta, DrSc., Výskumný ústav potravinársky, Bratislava	10 min
	Skúsenosti s využitím molekulárno-biologických metód pri sledovaní kontaminácie potravinárskych výrob	
	RNDr. Michal Slaný, Ph.D., VÚ veterinárního lékařství, v.v.i., Brno	15 min
	Rizika přenosu <i>Toxoplasma gondii</i> spojená s konzumací masných výrobků	
	Ing. Marija Kaevska, Ph.D., VÚ veterinárního lékařství, v.v.i., Brno	15 min
	Mikrobiální složení a detekce vybraných patogenů v různých částech čističky odpadních vod pomocí real time PCR a pyrosekvencování	
	Mgr. Romana Moutelíková, VÚ veterinárního lékařství, v.v.i., Brno	15 min
	Detekce a genetická analýza rotavirů skupiny C u prasat v ČR; jejich možný zoonotický potenciál	
13:20 – 13:50	<u>Závěr, diskuse</u>	
	Vyhodnocení soutěže o nejlepší prezentaci mladých autorů do 35 let	10 min
	Ing. Dalibor Novotný, Ph.D., Ing. František Šturm, Ph.D.	10 min
	„Deset ročníků v deseti minutách“	

Postery:

1. Mgr. Magdalena Dvořáková, Laboratoře AGEL a.s., Nový Jičín
Analýza velkých delecí a duplikací genu FBN1u pacientů s Marfanovým syndromem
2. RNDr. Olga Hrušková-Heidingsfeldová, CSc., Univerzita Pardubice
Analýza mobilních genetických elementů jako pomůcka při identifikaci patogenní kvasinky *Candida parapsilosis*
3. Mgr. Spiros Tavandzis, Laboratoře AGEL a.s., Nový Jičín
KAZUISTIKA: Detekce somatických mutací v cirkulující volné DNA (cfDNA) ve vztahu k léčbě onkologických pacientů
4. Ing. Arpád Bóday, Laboratoře AGEL a.s., Nový Jičín
Genetické a epigenetické změny a jejich vliv na prognostiku a predikci léčby kolorektálního karcinomu
5. RNDr. Michal Slaný, Ph.D., VÚ veterinárního lékařství, v.v.i., Brno
Výhody a nevýhody širokospektré identifikace bakterií pomocí sekvenace genu 16S rRNA
6. Mgr. Pavel Mikel, VÚ veterinárního lékařství, v.v.i., Brno
Příprava kontrolních armored RNA virus-like částic a jejich využití v detekci RNA virů
7. Ing. Lucie Hrušková, Univerzita Pardubice
PCR s využitím interkalačních barviv pro rozlišení živých a mrtvých buněk arkobakterů v biofilmu
8. Mgr. Rudolf Kukla, Univerzita Pardubice,
***Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* u pacientů v průběhu asistované reprodukce**
9. RNDr. Jana Prodělalová Ph.D., VÚ veterinárního lékařství, v.v.i., Brno
Využití molekulárně biologických metod v diagnostice virových chorob včel
10. Mgr. Vlasta Čejnová, Oddělení lékařské genetiky, Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.
QF-PCR a detekce mozaik v prenatální diagnostice

Prof. RNDr. Václav Pačes, DrSc.

Ústav molekulární genetiky AVČR, v.v.i.
Laboratoř genomiky a bioinformatiky
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4

tel: +420 241 063 541
e-mail: vaclav.paces@img.cas.cz

Od Gregora Mendela k personalizované medicíně

Pačes V.

Ústav molekulární genetiky AVČR, v.v.i.

Současné techniky stanovení struktury DNA pokročily natolik, že je možné levně a rychle přečíst si dědičnou informaci jednotlivých lidí. Bioinformatickými nástroji v ní lze hledat jednotlivé geny a mutace v těchto genech. Na základě těchto informací lze pro některé nemoci zavádět léčbu vhodnou pro konkrétního pacienta. Na této cestě k personalizované medicíně jsme však teprve na začátku.

Je zajímavé sledovat cestu od formulace zákonů dědičnosti Gregorem Johannem Mendelem přes objasnění molekulární podstaty dědičnosti až po současné aplikace moderní genetiky.

Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

Fakultní nemocnice Plzeň
ONM – Laboratoř imunochemické diagnostiky
tř. E. Beneše 13
305 99 Plzeň

tel: +420 377 402 948
e-mail: topolcan@fnplzen.cz

Přehled postupů v diagnostice nádorových onemocnění molekulárně biologickými technikami

Topolčan O., LF UK a FN Plzeň

Více než dvacet let se v rutinní praxi využívá stanovení nádorových markerů. Průběhem doby se našlo jejich optimální využití, ale především existuje i výrazná limitace těchto metod.

Metody molekulární biologie jsou zcela novým postupem jak z hlediska používaného biologického materiálu tak výpovědní hodnoty výsledku. Slouží již řadu jen ve velmi omezené míře v rutinní praxi. Především je snaha je využít pro záchyt geneticky podmíněných nádorových onemocnění. Rozsáhlé studie však existují ve výzkumu. Zde především výrazně zlepšily naše znalosti o etiopatogenezi nádorového procesu. Ruku v ruce s tím jak pokračuje snižování jejich metodické i ekonomické náročnosti začínají pronikat do rutinní praxe. V referátu bude diskutováno využití metod pro časnou diagnostiku nádorů, diferenciální diagnostiku a prognózu onemocnění. Zvláštní pozornost bude věnována problematice optimalizace volby léčby a to ze dvou hledisek – predikce efektu léčby a predikce vedlejších účinků léčby. Jde tedy jak o optimalizaci a individualisaci léčby ve vztahu k nádorovému procesu na straně jedné a k nemocnému na straně druhé.

Diskutovány budou hlavní problémy, se kterými se při použití metod a při interpretaci výsledků získaných metodami molekulární biologie v onkologii setkáváme. Kromě klasických problémů se specifitou a senzitivitou existuje značný problém při korelaci získaných laboratorních dat s klinickým obrazem. Specifickým problémem je problém tzv. „Big data“. Máme k dispozici obrovské množství dat, které nejsme schopni zatím klinicky využít. Je však nepochybné, že to budou metody molekulární biologie, které přinesou nový pokrok ve zlepšení kvality života onkologického pacienta.

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

Nestandardní nálezy v laboratorní dokumentaci a atypické výsledky vyšetření pomocí CE-IVD souprav určených pro analýzu lidské DNA

Beránek M.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Molekulárně biologické metody jsou někdy mylně pokládány za oblast vyšetření, která disponuje velkou měrou variability při výběru vhodné metodiky, možnostmi upravovat pracovní postupy a provádět laboratorní diagnostiku bez zajištění kontrolních mechanismů. Pravdou je, že tyto metody se v klinické praxi provádějí již přes dvacet let. Podléhají systémům interní i externí kontroly kvality, používají soupravy opatřené evropskými certifikáty pro prostředky in vitro diagnostiky (CE-IVD) a jako jediné laboratoře u nás jsou povinně akreditovány Českým institutem pro akreditaci (ČIA).

Název této pracovní konference zní Rutinní analýza nukleových kyselin (RANK). Molekulárně biologická vyšetření jsou do značné míry unikátní. Disponují specifickou technologií, mají specifický algoritmus operačních kroků a také používají specifické typy zkratk. Potýkají se však s obdobnými neshodami v preanalytické fázi a s obdobnými nedostatky CE-IVD souprav jako jiné laboratorní obory. Lze zmínit například ne zcela přesné překlady manuálů, absence informací v příbalových letáčcích či nepřesně značené doby použitelnosti reagenčních souprav. V přednášce budou krátce prezentovány časté formální nedostatky souprav a též příklady atypických (vzácnějších) výsledků vyšetření, které byly dosaženy pomocí validovaných a akreditovaných metod.

Mgr. Jana Sabová

Laboratoř molekulární diagnostiky, synlab genetics s.r.o.
Evropská 176/16
160 00 Praha 6

tel: +420 221 985 484
email: jana.sabova@hotmail.com

Molekulárne genetická diagnostika u vzácně sa vyskytujúcich dedičných ochorení

Sabová J., Štika J., Mazal O., Peková S.

Laboratoř molekulární diagnostiky, synlab genetics s.r.o., Praha

Vzácně ochorenia predstavujú klinicky heterogénnu skupinu rôznych ochorení s veľmi nízkou prevalenciou v populácii. V Európskej únii sú klasifikované ako ochorenia, ktoré sa vyskytujú u menej ako 5 pacientov na 10 000 obyvateľov. V súčasnej dobe je popísaných viac ako 6000 vzácných ochorení, ktorých etiológia je veľmi heterogénna. Až 80 % prípadov má genetický pôvod. Zriedkavé choroby majú závažný chronický, progresívny, degeneratívny a často život ohrozujúci charakter a môžu sa prejavíť v ktoromkoľvek štádiu vývoja jedinca. Príčinu niektorých vzácných chorôb predstavuje kombinácia genetických a vonkajších faktorov, avšak u väčšiny ochorení zostávajú príčiny doposiaľ neodhalené.

V súčasnosti vyšetrujeme v našom laboratóriu, v sekcii molekulárnej diagnostiky vzácných syndrómov, viac ako 50 dedičných ochorení, pričom sú stále diagnosticky zavádzané nové vyšetrenia a počet indikovaných vzácných syndrómov neustále stúpa. Pomocou technik priameho sekvenovania a celogenómového sekvenovania uskutočňujeme v laboratóriu komplexnú genetickú analýzu génov asociovaných so vzácnymi genetickými syndrómami: Sticklerov syndróm (COL2A1), Sotosov syndróm (NSD1), syndróm Noonanovej (PTPN11, SOS1), syndróm Leopard (RAF1), syndróm 3M (CUL7), Usherov syndróm (USH2A), aniridia (PAX6), geneticky podmienená chronická pankreatitída (SPINK1), Proteov syndróm (AKT1), Tricho-rhino-falangeálny syndróm (TRPS1), vývojové vady oka (HESX1, SOX2), syndróm Rubinstein-Taybi (CREBBP), Costellov syndróm (HRAS), Cockaynov syndróm (ERCC1, 2, 5, 6, 8), vrodenná hypercholesterolémia (LDLR), CHARGE syndróm (CHD7), mikrocefália (MCPH1), mnohopočetné vrodenné exostózy (EXT1, 2), okulárny albinizmus typ I (GPR143), X-viazaná retinitis pigmentosa (RPGR, RP2), neurodegeneratívne ochorenia (MAPT), X-viazaná hypofosfatémia (PHEX, FGF23), Alagillov syndróm (JAG1), Kallmanov syndróm (KAL1, FGFR1), syndróm CADASIL (NOTCH3) a mnoho ďalších. Najčastejšie sú sekvenované kódujúce oblasti vrátane exón/intrónových hraníc. Pomocou spomínaných metód sa nám podarilo u niekoľkých prípadov objasniť príčinu ochorenia na úrovni DNA, avšak stále ostáva mnoho prípadov s neobjasnenou diagnózou.

Radi by sme sa podelili o naše skúsenosti a prezentovali niekoľko zaujímavých výsledkov genetického vyšetrenia vzácných syndrómov (syndróm Noonanovej, CHARGE syndróm, Sotosov syndróm, vrodenné exostózy, prípadne ďalšie). Určenie správnej a včasnej diagnózy má veľký význam v prenatálnej a preimplantačnej diagnostike, a taktiež prispieva k celkovej informovanosti širokej odbornej či laickej verejnosti.

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

Screening karcinomu močového měchýře v selektovaných populacích – znovu a lépe

Scheinost O.

Nemocnice České Budějovice, a.s.

Molekulárně - genetická diagnostika nádorů je široce používaným způsobem, jak charakterizovat nádory z hlediska konkrétní diagnózy, terapie a prognózy. V přednášce bude popsán další možný přístup – screening přítomnosti nádoru. Tato problematika je demonstrována na příkladu karcinomu močového měchýře. Aktuálně je při diagnostice tohoto onemocnění používána kombinace cystoskopie + cytologie. Alternativou je řada nových neinvazivních testů, popsán bude screening pomocí FISH i možnosti definice populace, ve které takový screening probíhá.

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

Je NGS technologie dostatečně zralá pro rutinní testování prediktivních onkomarkerů?

Vohánka J.

Roche s.r.o., Praha

Technologie NGS prodělávají dramatický vývoj a jejich možnosti se den ode dne zvyšují. Je ale tento překotný vývoj skutečně pouze kladem a přidanou hodnotou pro testování pacientů, kde výsledek diagnózy je rozhodujícím článkem pro potvrzení protinádorové onkologické léčby? Jak snadno lze přenést vědecké metody a postupy do rutinních laboratoří, které v současné době využívají CE-IVD a FDA kompletně certifikované postupy? Ve sdělení bude diskutováno srovnání metod, výsledků a citace z různých publikací zabývajících se touto problematikou.

Mgr. Jiří Štika, Ph.D.

Laboratoř molekulární diagnostiky, synlab genetics s.r.o.
Evropská 176/16
160 00 Praha 6

tel: +420 221 985 484
e-mail: stikaj@gmail.com

Diagnostika autosomálně recesivní polycystické choroby ledvin pomocí NGS

Štika J., Sabová J., Mazal O., Peková S.

Laboratoř molekulární diagnostiky, synlab genetics s.r.o., Praha

Příčinou autosomálně recesivní polycystické choroby ledvin (ARPKD) jsou mutace v genu PKHD1, který je lokalizován na 6. chromozomu a tvoří jej 68 exonů. Incidence tohoto onemocnění je zhruba 1:30 000 obyvatel. Část dětí zemře brzy po narození většinou v důsledku nedostatečně vyvinutých plic. U přeživších bývá nemoc většinou odhalena záhy po narození, kdy jsou patrné deformity páteře a končetin, nápadně velké břicho a neobvyklý vzhled tváře. Postupně dochází k poklesu renálních funkcí až k úplnému ledvinovému selhání, ke kterému dochází již v dětském věku. Pacientům mohou naštěstí výrazně prodloužit život dialýza a transplantace.

K vyšetření mutačního stavu genu PKHD1 využíváme NGS techniku pyrosekvenování za použití sekvenátoru GS-Junior (Roche). Pro přípravu ampliconů využíváme tzv. univerzální design s využitím námi navržených primerů, které pokrývají kódující oblast včetně exon/intronových hranic.

Prozatím jsme vyšetřili 10 osob. U 4 osob byla v heterozygotní konfiguraci nalezena mutace Thr36Met, která byla popsána jako kauzální pro ARPKD. U všech 4 osob byla navíc nalezena druhá mutace, která by se mohla podílet na fenotypovém projevu. Jednalo se o mutace: Ile2957Thr, která byla popsána u pacientů s ARPKD a je rovněž považována za kauzální; Leu2128X, která vede k zařazení předčasného stop kodonu v exonu 39, jedná se o mutaci, jejíž nález nebyl (pokud je nám známo) dosud zaznamenán; Arg42Trp, jejíž nález rovněž nebyl zaznamenán a Gly112Arg, která představuje velice vzácně se vyskytující mutaci, jejíž klinický význam není jasný.

Naší metodou je možné spolehlivě vyšetřit mutační stav pacientů s ARPKD v řádů několika dnů. Pro další objasnění úlohy nalezených mutací při vzniku ARPKD je vždy potřeba vyšetřit další členy příslušných rodin.

MUDr. Soňa Fraňková

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

tel: +420 602 963 052
e-mail: sona.frankova@ikem.cz

Význam vyšetření genotypu IL28B v léčbě HCV infekce

Fraňková S.

Institut klinické a experimentální medicíny, Klinika hepatogastroenterologie

V současnosti je celosvětově infikováno virem hepatitidy C (HCV) přibližně 180 miliónů osob. Virem indukovaný zánět v játrech u neléčených jedinců vyvolává zvolna progredující fibrózu, u části pacientů (až u 20%) proces dospěje až do stadia jaterní cirhózy, která se dále komplikuje chronickým jaterním selháním a hepatocelulárním karcinomem.

V současné době je stále v ČR léčbou první linie u dosud neléčených pacientů s HCV infekcí kombinace peginterferonu a ribavirinu (PEG-IFN/RBV). Léčba vede k eradikaci HCV infekce celkově pouze zhruba u poloviny léčených nemocných, hůře léčitelní jsou zejména pacienti s genotypem 1, jeho prevalence mezi HCV infikovanými pacienty v ČR je bohužel asi 80 %. Za dosažení eradikace viru se považuje dosažení trvale negativní virémie léčbou, setrvalost odpovědi se hodnotí 24 týdnů po léčbě, vyléčení se proto nazývá „dosažením setrvalé virologické odpovědi (SVR)“. Genotyp viru je důležitým prediktorem úspěšnosti léčby, který známe ještě před zahájením terapie. Genotyp 1 odpovídá na léčbu PEG-IFN/RBV nedobře (42-65% SVR), pacienti s genotypem 2 a 3 dosahují SVR častěji (56-100%). Sérová koncentrace HCV RNA, tj. virémie před léčbou, takový význam nemá, pacienti s nízkou virémií (HCV RNA < 600000 IU/ml) však dosahují SVR častěji. Podíl pacientů, kteří dosáhnou SVR, klesá s pokročilostí fibrózy v játrech, u cirhotiků je šance dosáhnout SVR asi 10 %.

Přelomem v éře léčby HCV infekce PEG-IFN/RBV se stal objev skupiny jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v oblasti genu pro interleukin 28B na 19. chromozomu, který kóduje interferon λ3 (IL-28B). Genotyp nejčastěji zmiňovaného a klinicky užívaného SNP rs 12979860 (klinicky slangově nazýván jen „IL28B“) je v současnosti nejsilnějším prediktivním faktorem dosažení SVR známým ještě před léčbou, zejména u pacientů infikovaných genotypem HCV 1. Díky schopnosti predikce SVR (69 % SVR u pacientů s CC genotypem, 27-33% u pacientů s genotypy CT a TT léčených PEG-IFN/RBV) se stalo vyšetření genotypu IL-28B důležitým vyšetřením při plánování léčby, zejména u obtížně léčitelných nemocných (pokročilá fibróza, genotyp viru 1). Tento polymorfismus je asociován nejen s úspěšností léčby, ale také se schopností spontánní eliminace viru při akutní infekci. Rozdíly v regionální distribuci genotypů také vysvětlily dlouho nepochopitelnou rozdílnou odpověď na léčbu HCV infekce u různých ras.

Ing. Natalja Piskunova, CSc.

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

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

PCR diagnostika respiračních infekcí

Piskunova N., Trubač P.

Nemocnice České Budějovice, a.s.

Virová onemocnění patří k nečastějším onemocněním respiračního traktu zvláště v zimním období. Klinický obraz může vypadat velice rozmanitě - od lehkých příznaků po velice vážné a život ohrožující stavy. Počátek jejich diagnostiky lze datovat do 30. let dvacátého století, kdy byl objeven virus chřipky. Od té doby se spolu s popsáním dalších respiračních virů a jejich typů (enteroviry, adenovirus, RS virus, virus parainfluenzy...) vyvíjí i diagnostické postupy pro jejich detekci. V 90. letech nastává díky zavedení PCR metodik další pokrok v charakterizaci a průkazu těchto patogenů.

Na téměř tisícovém souboru pacientů jsme provedli v sezóně 2012 / 2013 PCR vyšetření pro virus chřipky, u 673 pacientů bylo provedeno i PCR vyšetření na celý panel respiračních virů obsažených v soupravách RV15, popř. RV16 od firmy Seegene. Na základě získaných dat jsme se pokusili zmapovat naši „respiračně virovou scénu“, koinfekce, výskyt v jednotlivých věkových skupinách a korelaci našeho nálezu s jinými laboratorními metodami a klinickým průběhem onemocnění.

V tomto sdělení jsou prezentovány výsledky detekce respiračních virů pomocí PCR diagnostiky a zajímavé záchyty. Jsou zde shrnuty výhody a nevýhody PCR, srovnání různých diagnostických metod a vhodnosti jejich použití.

RNDr. Jana Kašpírková, Ph.D.

Bioptická laboratoř s.r.o.
Mikulášské nám. 2
326 00 Plzeň

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

Molekulárně genetická detekce virových a bakteriálních patogenů pro diagnostiku infekční myokarditidy

Kašpírková J.¹, Solík P.², Šedivý J.³, Šíma R.⁴, Martínek P.¹.

¹ Bioptická laboratoř, s.r.o.

² Národní ústav srdečných a cévních chorob, a. s., Bratislava

³ Fakultní nemocnice Plzeň

⁴ Parazitologický ústav AVČR

Myokarditida je závažné onemocnění charakterizované zánětlivou infiltrací srdečního svalu. Příčinou může být expozice vnějším antigenům jako virům, bakteriím, parazitům či lékům, anebo expozice vnitřním antigenům, tedy autoimunní proces. Diagnostika myokarditidy je problematická díky heterogenitě klinických projevů. Tradičně vychází z klinického obrazu, fyzikálního a biochemického nálezu, z EKG, ECHO a vyšetření magnetickou rezonancí. Biopsie myokardu (EMB) je zlatým standardem k definitivnímu průkazu diagnózy a pro určení etiologie myokarditidy, nicméně je zatím indikována pouze zřídka. Je snaha tento trend změnit, neboť podle studií výsledky histologických a molekulárně genetických analýz mohou lépe zacílit doposud symptomatickou léčbu onemocnění. Na souboru 15 pacientů prezentujeme výsledky molekulárně-genetické detekce devíti virových a bakteriálních patogenů z biopsie myokardu a jejich korelaci s histologickým nálezem a klinickým průběhem onemocnění.

Mgr. Martina Sittová

GeneProof a.s.
Vídeňská 119
619 00 Brno

tel: +420 734 574 094
e-mail: sittova@geneproof.com

Detekce bakteriální rezistence molekulárně-biologickými metodami. Budeme léčit geny?

Sittová M., Hložek P., Dendis M.

GeneProof a.s.

Jedním z nejzávažnějších problémů současné medicíny je významný nárůst rezistencí k antimikrobiálním přípravkům. Současně je neustále zdůrazňováno rychlé nasazení adekvátní antibiotické léčby hlavně v případě život-ohrožujících septických stavů, kdy je nutné rozhodnout o zahájení terapie do jedné hodiny. Právě tento požadavek staví před klinickou mikrobiologií problém co nejrychlejší a nej přesnější detekce bakteriálního původce, včetně stanovení jeho citlivosti k antibiotikům.

Rezistence k antimikrobiálním přípravkům může být dána geneticky. Stanovení rezistence pomocí metody PCR se nabízí jako jedno z možných řešení. Přítomnost genu, ale ještě neznamená fenotypový projev a PCR nikdy nemůže nahradit flexibilitu mikrobiologických metod.

V naší laboratoři jsme zkoumali použití nové metody PCR i standardních mikrobiologických metod pro detekci širokospektrých beta-laktamáz (ESBL). Metoda PCR detekovala všechny mikrobiologicky ESBL pozitivní vzorky. Dále jsme detekovali o téměř polovinu více ESBL pozitivních vzorků než standardní kultivační metody. Žádné falešně negativní výsledky nebyly zaznamenány.

Výsledky nás vedly k otázce, jakým způsobem zařadit detekci rezistencí molekulárně biologickými metodami do léčebných guidelines, a to nejen v případě ESBL, ale i MRSA, VRE a dalších tak, abychom neléčili geny místo pacientů. Cílem přednášky je zhodnocení a možnost zařazení PCR detekce jako další metody pro detekci bakteriálních rezistencí obzvláště u pacientů v život-ohrožujícím stavu.

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

***Clostridium difficile* MLVA: metoda kontroly nozokomiálního přenosu**

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

¹ Ústav lékařské mikrobiologie, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze a FN v Motole

² DNA laboratoř KDN, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze a FN v Motole

Úvod:

C. difficile je významným nozokomiálním patogenem současnosti uváděným především v souvislosti s post antibiotickými průjmy. Incidence CDI (*C. difficile* infection) v posledních deseti letech globálně narůstá. Epidemiologický dohled nad výskytem v ČR není soustavně organizován. V roce 2012 byla laboratoř ÚLM ve FN Motole zařazena do projektu ECDIS-net (European *Clostridium difficile* surveillance network) s cílem navýšit celoevropskou laboratorní kapacitu diagnostiky CDI.

Metody a materiál:

Do studie byly zařazeny izoláty *C. difficile* vykultivované ze stolic pacientů se suspektní CDI na mikrobiologických odděleních FN Motol a 10 externích pracovištích za rok 2012. Všechny izoláty byly typizovány metodou PCR ribotypizace založenou na kapilární elektroforéze podle SOP ECDIS-net. Získané elektroforeogramy byly porovnány s Webribo databází (1). U prevalujícího ribotypu byla stanovena míra genetické příbuznosti metodou MLVA (Multi-Locus-Variable-Tandem-Repeats Analysis). Počet repetic byl stanoven v 7 VNTR úsecích Sangerovo sekvenováním (2). Ze získaných dat byl vygenerován MST (minimum spanning tree) pomocí softwaru Bionumerics v5.0.

Výsledky:

PCR ribotypizací bylo dourčeno 132 izolátů *C. difficile*. K ribotypu 176 příslušelo 78 (59%) vzorků. Pro MLVA analýzu jsme použili 45 kmenů *C. difficile* ribotyp 176 pocházejících z různých nemocnic. Porovnáním 7 VNTR úseků jsme prokázali klonální komplexy a úzkou genetickou příbuznost kmenů v rámci jednotlivých zařízení.

Závěr:

Prevalujícím ribotypem v ČR je ribotyp 176. Molekulární analýza vzájemné genetické příbuznosti kmenů s tímto ribotypem potvrdila schopnost nosokomiálního přenosu. Ribotyp 176 vykazuje značnou genetickou shodu s hypervirulentním ribotypem 027, který je zodpovědný za řadu epidemií v Evropě i v USA (3). Výskyt tohoto ribotypu byl zaznamenán na území ČR a Polska (4). Podle zjištěných výsledků se domníváme, že ribotyp 176 výrazně přispívá k významnému nárůstu incidence CDI v ČR.

Podpora:

MZ ČR – RVO FN v Motole 00064203 a IGA NT/14209

Literatura:

1. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler A, Wewalka G, Allerberger F, Kuijper EJ. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *J Med Microbiol.* 2008;57:1377-82
2. van den Berg RJ, Schaap I, Templeton KE, Klaassen CH, Kuijper EJ. Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *J Clin Microbiol.* 2007 Mar;45(3):1024-8
3. Valiente E, Dawson LF, Cairns MD, Stabler RA, Wren BW. Emergence of new PCR ribotypes from the hypervirulent *Clostridium difficile* 027 lineage. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 1):49-56
4. Nyč O, Pituch H, Matějková J, Obuch-Woszczatynski P, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* PCR ribotype 176 in the Czech Republic and Poland. *Lancet.* 2011;377(9775):1407

Mgr. Radka Kutová

ÚKBD - úsek molekulární biologie
Fakultní nemocnice Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové

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

Vyšetření rezistence na antivirotika u CMV infekcí

Kutová R., Plíšková L.

Fakultní nemocnice Hradec Králové, Ústav klinické biochemie a diagnostiky – úsek molekulární biologie

S cytomegalovirovými (CMV) infekcemi se v současné době nejvíce setkáváme u imunosuprimovaných pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně. Dlouhodobé podávání virostatik může vyvolat vznik rezistentních kmenů CMV. V léčbě těžkých CMV infekcí se uplatňují následující antivirotika – ganciclovir, valganciclovir, foscarnet, cidofovir, fomivirsen a další léčiva s proticytomegalovirovým účinkem se stále vyvíjejí.

Na našem pracovišti molekulární biologie Fakultní nemocnice Hradec Králové se zabýváme vyšetřením rezistencí na nejčastěji užívaná CMV antivirotika – ganciclovir, foscarnet, cidofovir. Rezistenci prokazujeme sekvenční analýzou vybraných částí genů UL 97 a UL 54 CMV genomu, kde hledáme klinicky významné mutace způsobující CMV rezistenci.

Otestovali jsme soubor 70 pacientů, u kterých bylo vysloveno podezření na CMV rezistenci. Z tohoto souboru jsme u 10 pacientů našli mutace v UL 97 (nejčastěji spojována s rezistencí na ganciclovir) a u 3 pacientů mutace v UL 54, z toho jeden pacient měl současně mutaci i v genu UL 97. V genu UL97 byly nejčastější mutace v kodonech 595 a 460. V genu UL54 (v oblasti nt 2644-2652) jsme u 4 pacientů zjistili totožnou inzerci kodonu AGC. Zatím nedokážeme říci, zda se jedná o klinicky významnou změnu.

Nejzásadnější je interpretace zjištěných nálezů, rozhodnutí, zda se jedná o klinicky významnou mutaci způsobující rezistenci na příslušné antivirotikum.

RNDr. Pavel Hložek

GeneProof, a.s.
Viniční 235
615 00 Brno

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

Validace a verifikace molekulárně biologických metod v analýze humánního a extrahumánního genomu

Hložek P., Sittová M., Dendis M.

GeneProof a.s.

Při rozšíření jakékoliv metodiky v klinické laboratorní praxi zákonitě přichází snaha o její přesnou validaci a charakterizaci. Existují obory, kde metodiky a přístupy k validaci metod již dosáhly požadované standardnosti a výsledné soubory validovaných parametrů jsou stanoveny podle přesně daných metodik a postupů.

Typickým příkladem kvalitní validace v oboru přesahujícím do biologie a lékařské praxe je soubor standardizovaných biochemických diagnostických metod. V tomto oboru jsou již přesně terminologicky ukotveny a definovány jednotlivé parametry a postupy jejich validace (viz např. Metrologická terminologie v analytické laboratoři, SEKK 2003, International Vocabulary of basic and general terms in metrology, VIM, a další...).

Bohužel je nutno říci, že ze strany producentů CE IVD diagnostických souprav v molekulární biologii je až na výjimky kvalita a především jednotnost v postupech a terminologii určující základní parametry diagnostik více než nepřehledná.

Naše laboratoř se již několik let snaží zaměřit na standardizaci metod, které by byly schopny obecně definovat alespoň základní kvalitativní a kvantitativní parametry běžně používaných molekulárně biologických metod již ze strany jejich producentů.

Cílem prezentace je poukázat (teoreticky i experimentálně) na metodickou, definiční a interpretační nejednotnost výrobců CE IVD diagnostik v určování základních parametrů jako je stanovení meze detekce (LOD), lineárního rozsahu měření a meze stanovitelnosti (LOQ) a vyvolat diskusi odborné veřejnosti, která by v budoucnosti mohla přinést ujednocení metod validace již na straně producentů PCR souprav a tím klinické laboratoři významně usnadnit rozhodování při volbě diagnostika.

RNDr. Tomáš Kuchta, DrSc.

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 v SR (najmä bryndziarne a menšie prevádzky spracúvajúce mäso) využívame, v prípade izolácie stafylokokov a listérií, molekulárno-biologické metódy na získanie upresňujúcich alebo doplňujúcich informácií o týchto baktériách. Takéto informácie sú užitočné z hľadiska sledovania priestorových a časových aspektov kontaminácie. V prvom rade 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*. Na bližšiu špecifikáciu izolátov využívame sekvenovanie viacerých lókusov (multi-locus sequence typing, MLST) a/alebo analýzu počtu viacerých tandemových opakovaní (multi-locus variable tandem repeat (VNTR) analysis, MLVA). V prípade MLST sa amplifikuje 7 lókusov (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* a *yqjL*), produkty sa prečistia a sekvenujú. Za efektívnejšiu však považujeme metódu MLVA, ktorá je jednoduchšia, rýchlejšia a pritom dostatočne diskriminatívna. V prípade MLVA multiplexnou PCR amplifikujeme fragmenty 5 lókusov (*clfA*, *clfB*, *spa*, *spp* a *sdr*) a amplifikované produkty separujeme elektroforézou na gélovej kolóne s použitím prístroja QIAxcel (Qiagen, Hilden, Nemecko). V rozsiahlejšej štúdii sme získali 256 izolátov *Staph. aureus* z 98 vzoriek (34 sterov z potravinárskych výrob a 64 vzoriek potravín). Použitím MLVA sme získali 31 typov profilov, čo predstavovalo pomerne vysokú diskrimináciu. Po jednom kmeni z každého typu MLVA profilu sme typizovali tiež pomocou MLST, pričom sme konštatovali porovnateľnú diskriminatívnu úroveň uvedených metód na danom súbore kmeňov. Vysokodiskriminatívna poddruhová typizácia baktérií umožnila sledovať kontamináciu výrob perzistentnou mikroflórou, identifikovať zdroje kontaminácie a regulovať sanitáciu.

RNDr. Michal Slaný, Ph.D.

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

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

Rizika přenosu *Toxoplasma gondii* spojená s konzumací masných výrobků

Slaný M., Lorencová A., Kříž P.

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

Infekce způsobená *T. gondii* je jednou z nejrozšířenějších parazitárních zoonóz. Konzumace nedostatečně tepelně opracovaného vepřového masa je považována za hlavní riziko infekce člověka. Standardně používané postupy chovatelů prasat snížily riziko jejich infekce. V poslední době stále populárnější ekologické zemědělství může být rizikovým faktorem, neboť prasata nejsou odděleny od vnějšího prostředí, což zvyšuje riziko zavlečení patogenu do chovu. Příspěvek přináší nejnovější poznatky výskytu *T. gondii* v konvenčních a ekologických chovech prasat v České Republice a také budou diskutovány možné důsledky pro bezpečnost potravin.

Ing. Marija Kaevska, Ph.D.

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

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

Mikrobiální složení a detekce vybraných patogenů v různých částech čističky odpadních vod pomocí pyrosekvenování a real time PCR

Kaevska M., Vídeňská P., Vašíčková P.

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

V současné době existuje více technologií čištění odpadních vod. Většina je založena na mechanických, biochemických a chemických procesech. Během mechanického čištění dochází k odstranění hrubých nečistot. Potom následuje čištění pomocí biochemických procesů, za pomoci mikroorganismů obsažených v tzv. aktivovaném kalu. Aktivovaný kal odstraní značné množství organického znečištění i sloučenin dusíku a fosforu. Sledování bezpečnosti odpadních vod je důležité pro opětovné použití vody a možnou cirkulaci lidských nebo zvířecích patogenů ve vnějším prostředí.

V naší studii jsme použili vzorky z čistírny odpadních vod v Brně. Bylo vzorkováno vstupní a výstupní místo během 24 hodin. Dále byly jednorázově odebrány vzorky všech aktivačních nádrží a také vzorek vratného kalu. Izolované nukleové kyseliny byly použity jak na detekce vybraných patogenů pomocí real time PCR, tak i do PCR reakce na amplifikace genu pro bakteriální 16S rRNA univerzálními primery. Amplikony byly následně sekvenovány za použití platformy 454 od firmy Roche.

Výsledky byly analyzovány pomocí programu Qiime. Získali jsme cca 33000 sekvencí s dostatečnou kvalitou a velikostí. Vzorek ze vstupní vody obsahoval *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*. Vzorky z různých aktivačních nádrží a vratný kal měly podobné bakteriální složení. Nejčastější zastoupené byly *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, dále *Chlorobi* a *Nitrospirae*. Voda opouštějící čistírny měla podobný obsah, avšak zvláštní bylo zvýšené množství kmenu *Actinobacteria*. Ve výpustní vodě jsme detekovali různé zástupce druhu *Mycobacterium avium* v množství kolem 10^3 buněk/ml vody a také zástupce *Norovirus* ze skupiny 1 a 2.

Pyrosekvenování umožňuje komplexní přehled bakteriálních druhů přítomných v odpadních vodách před, během a po jejím biologickém čištění, zatímco pomocí real time PCR jsme schopni různé patogenní druhy kvantifikovat.

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. Romana Moutelíková

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

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

Detekce a genetická analýza rotavirů skupiny C u prasat v České republice a jejich možný zoonotický potenciál

Moutelíková R., Dufková L., Prodělalová J.

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

Rotaviry jsou neobalené viry z čeledi *Reoviridae* s poměrně složitou morfologií. Kompletní virion je tvořen jádrem s 11 segmenty dsRNA a ostře ohraničenou trojvrstevnou kapsidou s typickou strukturou. Rod *Rotavirus* zahrnuje nejméně 7 skupin (A-G) rozlišovaných podle hlavního skupinového antigenu, kterým je vnitřní kapsidový protein VP6. Jediné rotavirové skupiny, které jsou schopné způsobit průjmové onemocnění u lidí, jsou skupiny A, B a C (RVA, RVB, RVC), které byly také prokázány u různých druhů domácích zvířat a drůbeže. RVA jsou považovány celosvětově za nejdůležitějšího původce těžkých gastroenteritid u malých dětí; každoročně jsou příčinou více než 400 000 úmrtí u dětí mladších 5 let.

RVC byly poprvé detekovány v roce 1982 v USA u selat s příznaky průjmového onemocnění, o dva roky později byly prokázány jako příčina gastroenteritidy u pacienta v Austrálii. Porcinní RVC jsou v prasečích chovech běžně rozšířeny ve všech věkových kategoriích, prevalence protilátek proti RVC u prasat stoupá s věkem, u dospělých kusů dosahuje až 97%. Na možný zoonotický přenos RVC ukazovaly nálezy zvýšené hladiny protilátek proti RVC u obyvatel venkova (studie prováděná v Anglii a Walesu). Genetická analýza kmenů cirkulujících mezi dětskými pacienty v Brazílii prokázala přítomnost prasečích kmenů, čímž byl zoonotický potenciál RVC potvrzen.

Vzhledem k odlišným imunologickým vlastnostem jednotlivých rotavirových skupin není možné tzv. non-A skupiny rotavirů detekovat běžnými diagnostickými soupravami zaměřenými na průkaz RVA antigenu metodou ELISA, imunochromatograficky či latexovou aglutinací. Pro přesné vyhodnocení prevalence těchto rotavirových skupin a jejich podílu na celkovém množství gastroenterálních onemocnění je proto nutné použít molekulárně biologické metody, jako je reverzní transkripce a následná nested-PCR (RT-nPCR) či PCR v reálném čase (RT-qPCR).

V naší práci zaměřené na RVC jsme zjišťovali epizootologickou situaci v chovech prasat v České republice. Detekce rotavirů skupiny C byla prováděna ze vzorků trusu (plemenní kanci, prasnice, selata ve věku 0-12 týdnů) a ze střevního obsahu (jatečná prasata). RT-nPCR byla provedena za použití primerů specifických pro gen kódující skupinový protein VP6. Ze souboru 293 vyšetřených vzorků bylo u 25,6% zjištěna přítomnost specifické RNA. Pro vyhodnocení genetické heterogenity a možné příbuznosti s lidskými kmeny byla zjištěna sekvence téměř celého segmentu kódujícího jedné VP6 a dále dvou segmentů kódujících strukturní proteiny VP4 a VP7, které vyvolávají tvorbu neutralizačních protilátek. Tyto sekvence byly srovnány mezi sebou a dále s jinými VP4, VP6 a VP7 sekvencemi porcinních, bovinních a lidských kmenů RVC, které jsou dostupné v databázi GenBank.

Tato práce byla provedena s podporou grantů Ministerstva zemědělství ČR (QH81061) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt AdmireVet č. CZ1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01).

Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř lékařské genetiky – úsek molekulární biologie
Revoluční č. 2214/35
741 01 Nový Jičín

tel: +420 556 416 231
e-mail: magdalena.dvorakova@lag.agel.cz

Analýza velkých delecí a duplikací genu *FBN1* u pacientů s Marfanovým syndromem

Dvořáková M.^{1,2}, Cibulková P.^{1,2}, Křenková R.^{1,2}, Indráková J.^{1,2}, Richterová R.^{1,2}

¹ Laboratoř lékařské genetiky – úsek molekulární biologie, Laboratoře AGEL, a.s.

² Vzdělávací a výzkumný institut AGEL, o.p.s. – pobočka Nový Jičín, Laboratoře AGEL, a.s.

Marfanův syndrom (MFS) je dědičné autozomálně dominantní onemocnění pojivové tkáně s incidencí 1 : 5 - 10 000. Přibližně u 25% pacientů se MFS vyskytuje v důsledku *de novo* mutace. Klinicky se vyznačuje velkou variabilitou. Mezi hlavní příznaky patří poruchy kardiovaskulárního systému – především dilatace a disekce vzestupné aorty, očního systému – ectopia lentis a kostního systému – pectus carinatum nebo excavatum, arachnodaktylie a další. Klinická diagnostika se řídí Ghentskými kritérii.

Příčinou onemocnění jsou mutace v genu *FBN1* (15q15-q21.1). Produktem tohoto genu je extracelulární glykoprotein fibrillin-1, který je součástí elastických i non-elastických mikrofibril pojivových tkání. Dalšími geny, které jsou asociovány s MFS jsou *TGFBR2* (3p22) a *TGFBR1* (9q22).

DNA byla izolována z periferní krve. Následná MLPA analýza (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) byla provedena kity Marfan syndrom-1 a Marfan syndrom-2 (MRC-Holland). Pro vyhodnocení byl použit software Coffalyser.net (MRC-Holland). V případě pozitivního záchytu bylo Sangerovým sekvenováním ověřeno, že se nejedná o sekvenční změnu v místě sondy.

U dvou pacientů, kteří splňují revidovaná Ghentská kritéria byla zjištěna velká delece genu *FBN1*. V prvním případě se jedná o delecí exonu 10 a ve druhém o delecí exonů 7 až 66.

Tyto delece nejsou uvedeny v databázích mutací a nebyly popsány v odborné literatuře. Vzhledem k jejich rozsahu předpokládáme, že se jedná o kauzální mutace.

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

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR
Flemingovo nám. 2
166 10 Praha 6

tel: +420 466 037 779
e-mail: olga.hruskova@upce.cz

Analýza mobilních genetických elementů jako pomůcka při identifikaci patogenní kvasinky *Candida parapsilosis*

Hrušková-Heidingsfeldová O.

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd

Kvasinka *Candida parapsilosis* je významný oportunistický patogen. Genetické rozdíly mezi klinickými izoláty *C. parapsilosis* vedly k rozdělení tohoto druhu do tří podskupin (*C. parapsilosis* I, II a III). V roce 2005 byly skupiny II a III definovány jako nové biologické druhy s názvy *Candida orthopsilosis* a *Candida metapsilosis*¹. U pacientů se nejčastěji vyskytuje *C. parapsilosis sensu stricto*. *C. orthopsilosis* a *C. metapsilosis* dohromady představují zhruba 10 % klinických izolátů. Tyto tři druhy, označované někdy jako „psilosis komplex“ nelze rozlišit rutinními biochemickými testy (např. API). Správná identifikace je však důležitá, protože jednotlivé druhy se mezi sebou liší schopností narušovat epitel a citlivostí vůči antimykotikům.

Původní protokol pro rozlišení uvedených druhů je založen na RAPD analýze a na amplifikaci úseků několika genů, které poskytují různě dlouhé PCR produkty pro jednotlivé druhy. I když byly možnosti rozlišení druhů v rámci „psilosis komplexu“ postupně rozšířeny, potřeba dalších identifikačních protokolů trvá, mimo jiné kvůli předpokládané vnitrodruhové variabilitě *C. orthopsilosis* a *C. metapsilosis*.

Na začátku této práce stála otázka, nakolik lze k rozlišení druhů v rámci „psilosis komplexu“ použít (retro)transpozony, jejichž analýza by mohla také přispět k lepšímu pochopení evoluce od *C. metapsilosis* a *C. orthopsilosis* k úspěšnějšímu patogenu *C. parapsilosis*. Genomy *C. parapsilosis* a *C. orthopsilosis* jsou veřejně dostupné, ale jen částečně anotované. Genom *C. metapsilosis* zatím není k dispozici. Proto byly nejprve vybrány sekvence mobilních genetických elementů z dobře anotovaného genomu kvasinky *Candida albicans* a použity k in silico hledání homologických sekvencí v genomu *C. parapsilosis*. Takto byl nalezen transpozon CpFot1 a retrotranspozon CpZorro3.

Experimentální ověření přítomnosti těchto elementů bylo provedeno v klinických izolátech *C. parapsilosis* (n=5), *C. orthopsilosis* (n=6) a *C. metapsilosis* (n=8) pomocí Southern blotů. Oba elementy byly přítomny ve všech studovaných izolátech *C. parapsilosis*, ne však v *C. orthopsilosis* a *C. metapsilosis*. Sekvence genů pro reverzní transkriptázu CpZorro3 a pro transpozázu CpFot1 byly identické ve třech kmenech z pěti studovaných. Ve zbývajících dvou bylo nalezeno po jedné mutaci. To je v souladu s hypotézou, že *C. parapsilosis* je ze všech tří druhů nejmladší a vnitrodruhová variabilita je u ní tudíž nejmenší. Na základě získaných údajů byly optimalizovány primery, pomocí kterých lze amplifikovat krátké úseky z CpFot1 a CpZorro3, přičemž produkt poskytnou jen izoláty *C. parapsilosis*, nikoli *C. orthopsilosis* a *C. metapsilosis*. Jedna PCR reakce tedy pomůže upřesnit identifikaci *C. parapsilosis* u klinických izolátů, které rutinní biochemické testy zařadily do „psilosis komplexu“.

1. Tavanti et al. (2005) J. Clin. Microbiol. 43, 284-292

Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř lékařské genetik, úsek molekulární biologie
Revoluční č. 2214/35
741 01 Nový Jičín

tel: +420 556 416 234
e-mail: spiros.tavandzis@lag.agel.cz

KAZUISTIKA: Detekce somatických mutací v cirkulující volné DNA (cfDNA) ve vztahu k léčbě onkologických pacientů.

Tavandzis S.¹, Bóday A.¹, Krhutová V.¹, Vaníčková P.¹, Hodslavská V.¹, Horká K.¹, Donociková B.³, Baník M.², Kudělka L.², Galiová D.², Mariančíková P.², Gruna J.³, Wendrinski A.³

¹ Laboratoř lékařské genetiky - úsek molekulární biologie, Vzdělávací a výzkumný institut AGEL, o.p.s. – pobočka Nový Jičín, Laboratoře AGEL, a.s.

² Laboratoř patologie, Vzdělávací a výzkumný institut AGEL, o.p.s. – pobočka Nový Jičín, Laboratoře AGEL, a.s.

³ Komplexní onkologické centrum Nový Jičín, Oddělení radioterapie a onkologie

V tomto sdělení demonstrujeme na třech klinických případech (pacientka s karcinomem prsu a 2 pacienti s karcinomem kolorekta - CRC) možnost využití analýzy somatických mutací v séru ke sledování progresu onemocnění.

U pacientky se sporadickou formou nádoru prsu jsme měli k dispozici biopsii primárního nádoru, vzorek tkáně po ablaci, které předcházela neoadjuvantní terapii, séra před operací a po operaci. U dvou pacientů s CRC jsme měli k dispozici primární nádorovou tkáň, séra odebírána pravidelně po operaci a u jednoho pacienta také metastatickou tkáň.

Pro analýzu byla použita DNA izolována z nádorové tkáně (QuickGene DNA tissue kit S (Kurabo)) a ze séra pacientů (FitAmp Plasma/Serum DNA Isolation Kit – Epigentek). Detekce mutací v genech KRAS (kodony 12, 13, 61), PIK3CA (p.E542K, p.E545K, p.E545G, p.H1047R, p.H1047L) nebo BRAF (p.V600E) byla provedena metodami real-time PCR a shifted termination assay – STA (Trimgen) na přístrojích LightCycler II/480 (ROCHE) a ABI3130.

U všech pacientů byla v primární nádorové tkáni detekována mutace genu KRAS, přítomnost mutací v ostatních genech nebyla zjištěna. Záchyty v genu KRAS byly detekovány také v sérech jednotlivých pacientů, u kterých byl zároveň sledován průběh léčby a jejich klinický stav.

V této práci dále diskutujeme výhody a úskalí využití molekulárních metod v prognostice a predikci léčby onkologických pacientů.

Laboratoře AGEL a.s.
Laboratoř lékařské genetiky, úsek molekulární biologie
Revoluční č. 2214/35
741 01 Nový Jičín

tel.: +420 556 416 233
e-mail: arpad.boday@lag.agel.cz

Genetické a epigenetické změny a jejich vliv na prognostiku a predikci léčby kolorektálního karcinomu

Bóday A.¹, Krhutová V.¹, Tavandzis S.¹, Horká K.¹, Dvořáková H.¹, Vaníčková P.¹, Ryšková J.², Janečková A.², Němeček M.³, Kasperčík I.³

¹ Laboratoř lékařské genetiky, úsek molekulární biologie, Laboratoře AGEL a.s., Nový Jičín; Vzdělávací a výzkumný institut Agel o.p.s. - pobočka Nový Jičín

² Oddělení radioterapie a onkologie, Nemocnice Nový Jičín

³ Laboratoř patologie, Laboratoře Agel a.s., Nový Jičín; Vzdělávací a výzkumný institut Agel o.p.s. - pobočka Nový Jičín

Úvod:

Vznik kolorektálního karcinomu (CRC) je víceetapový proces. Zahrnuje řadu různých molekulárních událostí, které způsobují postupnou přeměnu epitelu na karcinom se třemi poměrně dobře definovanými cestami. Onemocnění lze rozdělit do několika molekulárních subtypů s odlišnou biologii. Tyto subtypy se vyznačují více či méně specifickými morfologickými a histologickými vlastnostmi s různými reakcemi na terapii.

Cíl práce:

Cílem této práce byla genetická a epigenetická charakterizace CRC ve skupině 267 pacientů. DNA byla izolována z mražených nádorových a normálních tkání. Mikrosatelitová instabilita (MSI) a ztráta heterozygosity (LOH) byly studovány v lokusech D2S123, D5S346, D5S299, D17S250, D18S35, BAT25, BAT26 a BAT40. Cílená analýza mutací byla zaměřena na geny *K-ras* (kodony 12, 13 a 61), *BRAF* (V600E mutace) a *PIK3CA* (E542K, E545K, E545G, H1047R a H1047L mutace). Hledání mutací bylo provedeno v genech *APC* (exon 15) a *TP53* (exony 5-9). Metylační status byl analyzován v promotorech genů *MLH1*, *APC*, *CDKN2A*, *TP53*, *MGMT* a v lokusech MINT1, MINT2, MINT17, MINT31.

Výsledky:

MSI byla nalezena ve 28 karcinomech z 267 (10,5%) a LOH v jednotlivých genech byla stanovena s frekvencí u *APC* 11,6%, *hMSH2* 3,4%, *BRCA1* 3,4%, *DCC* 4,1%, *c-Kit* 1% a *HSD3B1* 0,8%.

V analyzovaném souboru CRC pacientů byla detekována frekvence *K-ras* mutací 38,5%, *BRAF* mutace 6,8% a *PIK3CA* mutací 7,2%.

Kauzální mutace byly zjištěny v 39% případů v *APC* genu a 12% v genu *TP53*.

Hypermetylace tumorsupresorů byla prokázána v genech *APC* (37,2%), *hMLH1* (18,5%), *TP53* (11,8%), *CDKN2A* (15,7%), *MGMT* (31,5%) a v lokusech MINT1 (27,1%), MINT2 (42,9%), MINT17 (8,9%), MINT31 (17,8%).

Diskuze a závěr

V této studii předkládáme a polemizujeme o možnosti zařazení jednotlivých případů CRC do molekulárních subtypů v kontextu patologických, histologických a imunohistochemických výsledků a diskutujeme využitelnost molekulárně genetických výsledků v prognostice onemocnění a v predikci léčby. Výsledky se shodují s publikovanými údaji a potvrzují, že celková akumulace změn, spíše než sled událostí určuje biologickou povahu a progresi kolorektálního karcinomu. Ačkoli naše znalosti o vzniku CRC nejsou daleko úplné, použitelnost molekulární genetiky je nepostradatelná v onkologické praxi.

Práce byla podporována grantem Interní grantové agentury společnosti Agel a.s.: „Studium genetických a epigenetických změn u sporadických forem kolorektálního karcinomu“

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

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

Výhody a nevýhody širokospektré identifikace bakterií pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA

Slaný M.

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

Klasická diagnostika bakteriálních infekcí je založena na přímém mikroskopickém vyšetření a kultivaci. V dnešní době jsou k dispozici také molekulární nástroje umožňující rychlejší a přesnější diagnostiku bakteriálních infekcí. Tyto metody umožňují detekci bakterií přímo v klinických materiálech, ačkoli primárně jsou stále používány kultivační přístupy. Pro účely přesné a rychlé identifikace bakterií je nejčastěji používána sekvenční analýza vybraných cílových genů (např. *16S rRNA*, *rpoB*, *hsp60*), která má několik technických omezení. Tento příspěvek si klade za cíl shrnout dostupné algoritmy, využívající sekvenční analýzu genu pro 16S rRNA, používané pro detekci bakterií a také přiblížit technické problémy a omezení spojené s použitím této metody.

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

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

Příprava kontrolních armored RNA virus-like částic a jejich využití v detekci RNA virů

Mikel P.^{1,2}, Vašíčková P.¹, Tesařík R.¹, Kulich P.¹, Malenovská H.¹, Králík P.¹

¹Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

²Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Úvod: RNA viry jsou původci mnoha závažných infekčních onemocnění postihujících lidi a zvířata např. chřipka, hepatitida (HAV, HCV, HEV), slintavka a kulhavka, klíšťová encefalitida atd. K detekci a kvantifikaci RNA virů se využívá reverzně transkripční real-time PCR (qRT-PCR). Analýza RNA virů je ve srovnání s analýzou DNA virů náročnější a komplikovanější metodou a to především kvůli kroku reverzní transkripce před samotnou PCR. Překážku rutinní analýze RNA virů pomocí qRT-PCR představuje zejména nedostatek spolehlivých RNA pozitivních standardů, které by umožnily kontrolu všech kroků analýzy virové RNA. Cílem této studie proto byla příprava armored RNA virus-like (aRNA) částic s využitím balicího systému bakteriofága MS2. Částice aRNA obsahují definovanou kontrolní RNA zabalenou do fágových hlaviček, které ji chrání před degradací RNázami.

Metodika: Částice aRNA byly připraveny s využitím bioinformatické analýzy sekvencí, klonování a sekvenování specifických restričních fragmentů a PCR amplikonů, western blot analýzy, ultrasonifikace a elektronové mikroskopie.

Výsledky: S využitím výše zmíněných metod byly připraveny aRNA částice nesoucí námi navrženou, specifickou sekvencí kontrolní RNA. Byla ověřena jejich schopnost odolávat působení RNáz. Připravené aRNA částice byly úspěšně využity jako kontrolní částice v qRT-PCR pro detekci a kvantifikaci RNA virů. Tyto částice nejsou infekční a nemají schopnost se replikovat a kontaminovat tak laboratorní prostředí. Ve srovnání s čistou RNA je stabilita aRNA částic mnohem vyšší a mohou tak být uchovávány v různých podmínkách po dlouhou dobu bez rizika degradace. aRNA částice také napodobují analyzované RNA viry, čímž dále zvyšují specifitu analýzy.

Tato práce byla podpořena granty: NT13884-4/2012 a AdmireVet CZ1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01.

Katedra Analytické chemie
Fakulta chemicko-technologická
Univerzita Pardubice
Studentská 573
532 10 Pardubice

tel: +420 466 037 775
e-mail: lucka.hruskova@centrum.cz,

PCR s využitím interkalačních barviv pro rozlišení živých a mrtvých buněk arkobakterů v biofilmu

Hrušková L.^{1,2}, Motřková P.², Vyřasová J.²

¹Katedra Analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

²Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,

Rod *Arcobacter* jsou gram-negativní zakřivené bakterie, nesporulující, pohyblivé a úzce příbuzné kampylobakterům. Tyto bakterie rostou za mikroaerobních podmínek a teplotě 15 °C až 37 °C. Mohou však růst i v aerobním prostředí a některé kmeny i při 42 °C. Vyskytují se ve všech typech vod, potravinách živočišného původu či plodech moře.

Arkobaktery mohou tvořit mikrobiální biofilm, což je organizovaný systém buněk rostoucích na různých površích, jako jsou plasty, sklo, kovy a dřevo vystavené vodnímu prostředí. Mikroby tvoří biofilm z řady důvodů, mezi které patří snadná výměna genetického materiálu mezi mikroorganismy a přenos živin, které jsou ve vodné fázi mnohem lépe dostupné. Biofilm zabraňuje přístupu biocidů, a protože je z velké části tvořen vodou, brání buněčnému vysychání. Pokud se vyskytuje v potravinářských závodech, může při výrobě či balení potravin docházet k uvolňování buněk biofilmu a tím ke kontaminaci produktu. Pokud se jedná o biofilm tvořený patogenním mikroorganismem, může nejen u personálu, ale i u spotřebitele, který s biofilmem přišel do kontaktu, vyvolat různá onemocnění. Mezi tato onemocnění patří například listeriózy, kampylobakterií, kožní záněty, pneumonie, meningitidy a mnoho dalších. Biofilm může výrazným způsobem znehodnotit i materiály se kterými přichází do kontaktu.

Mikroorganismy vázané k povrchu, který je ve styku s potravinami, představují potenciální nebezpečí, proto je důležité tyto mikroby detekovat. V dnešní době jsou široce využívány metody molekulárně-biologické založené na PCR. Tyto metody mají celou řadu výhod, ale samozřejmě i jisté nevýhody. V potravinách i v životním prostředí se vyskytují jednotlivé druhy bakterií v malém zastoupení. Dále mohou vzorky obsahovat inhibitory PCR, které mohou mít za následek falešně negativní výsledky, což vyžaduje zavedení dodatečných purifikačních postupů. Pomocí těchto metod lze s využitím interkalačních barviv stanovit i životaschopnost buněk, například právě v bakteriálním biofilmu. EMA (ethidium monoazid) a PMA (propidium monoazid) jsou interkalační barviva, která mají schopnost proniknout do mrtvých buněk a kovalentně se vázat na DNA, čímž snižují PCR signál pocházející z mrtvých buněk a naopak signál z buněk živých je zesílen. V kombinaci s kvantitativní PCR lze takto sledovat například účinnost desinfekčních prostředků aj. Kvantitativní PCR je jedna z nejvíce využívaných metod pro přímou detekci a kvantifikaci patogenů v potravinách, životním prostředí a klinických vzorcích.

Výhodami těchto metod jsou rychlost, specifická a přesnost, naopak velkou překážkou pro metody založené na detekci DNA je stabilita nukleové kyseliny i po smrti buňky, a to několik dnů až týdnů.

Tato práce je zaměřena na detekci životaschopných buněk v bakteriálním biofilmu metodou EMA/PMA-PCR u zástupců rodu *Arcobacter*.

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

tel: +420 466 037 714
e-mail: rudolf.kukla@student.upce.cz

***Mycoplasma hominis* a *Ureaplasma urealyticum* u pacientek v průběhu asistované reprodukce**

Kukla R.¹, Slehová E.¹, Boštíková V.², Hampl R.³, Novotná Š.³, Slehá R.^{1,2}, Salavec M.⁴, Štěpán J.³, Mazurová J.²

¹Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

²Katedra epidemiologie, Fakulta vojenského-zdravotnictví, Univerzita obrany Hradec Králové

³Centrum asistované reprodukce SANUS, Pardubice

⁴Klinika a katedra nemocí kožních a pohlavních FN a LFUK, Hradec Králové

Mycoplasma (M.) hominis a *Ureaplasma (U.) urealyticum* jsou významné patogenní bakterie, jejichž výskyt je spojován s patologickými procesy, které mohou vyústit v urogenitální infekce mužů i žen. Zmiňován je i negativní vliv uvedených agens na lidskou reprodukci, který je v současné době předmětem studia řady pracovišť zaměřených na tuto problematiku.

V naší studii jsme sledovali výskyt *M. hominis* a *U. urealyticum* v genitálním ústrojí žen, léčených v Centru asistované reprodukce SANUS v Pardubicích. Laboratorní průkaz jsme prováděli ze stěrů z krčku děložního metodou Real-time SybrGreen PCR s primery specifickými pro uvedené druhy. Výsledky jsme současně porovnávali s kultivačním vyšetřením.

Celkově jsme vyšetřili 91 cervikálních stěrů. *M. hominis* jsme prokázali u 6 (6,6 %) pacientek, zatímco *U. urealyticum* jsme detekovali ve 34 (37,4 %) vzorcích. Ve 3 (3,3 %) případech jsme zaznamenali současný výskyt *M. hominis* a *U. urealyticum*. Výsledky naší práce ukazují na vyšší výskyt ureaplazmat v genitálním ústrojí žen v asistované reprodukci.

Práce byla realizována za podpory grantů SGFChT/2013.

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

tel: +420 777 786 321
e-mail: prodelaova@vri.cz

Využití molekulárně biologických metod v diagnostice virových chorob včel

Prodělalová J.¹, Titěra D.²

¹Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

²Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., Dol

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří mezi významné opylovače kulturních i volně rostoucích rostlin a spolu s dalšími opylovači významně přispívá k produkci potravin rostlinného původu a v neposlední řadě také k udržení biodiverzity. V současnosti je popsána řada parazitů a patogenů (viry, bakterie, mikrosporidie, roztoči), kteří negativně ovlivňují včelstva, zejména oslabením početnosti kolonií, v extrémním případě kolapsem včelstev. To vede následně k závažným ekonomickým ztrátám. **Cílem prezentace je přehledně popsat nejvýznamnější virové patogeny včel a možnosti jejich diagnostiky založené na detekci virového genomu.**

Virové infekce včel jsou intenzivně studovány zejména v posledních patnácti letech. Viry včely medonosné jsou všeobecně rozšířeny a nejčastěji se vyskytují ve formě inaparentní infekce. U včel bez klinických příznaků jsou velmi často detekovány směsné virové infekce. K aktivaci virové infekce a následně vzniku klinických příznaků vede zejména vliv negativních faktorů vnějšího prostředí a přítomnost parazitů. Od roku 1963, kdy byly poprvé izolovány viry akutní a chronické paralýzy včel, byly u evropských včel identifikovány a popsány dvě desítky virů. Výzkum včelích virů je však komplikován zejména chybějícími buněčnými liniemi, na kterých by bylo možné včelí viry pomnožovat. Vzhledem k tomu, že kromě dvou výjimek se jedná o viry s pozitivní jednořetězcovou RNA (+ssRNA), je u včelích virů, podobně jako u ostatních RNA virů, popsána značná míra proměnlivosti, která je daná vysokou četností mutací v jejich genomu. To ztěžuje jak jejich diagnostiku, tak i klasifikaci. Převažující většina včelích virů je řazena do čeledí *Dicistroviridae* a *Iflaviridae*. Obě uvedené čeledě na základě společných vlastností tvoří spolu s mnoha dalšími viry patogenními pro člověka, živočichy a rostliny řád *Picornavirales*. Ve včelstvech v České republice byly doposud popsány následující viry včel: *Deformed wing virus* (DWV), *Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Sacbrood virus* (SBV), *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) a *Black queen cell virus* (BQCV)^a. Epidemiologické studie prokázaly celosvětový výskyt virů včel. K nepříznivé epidemiologické situaci přispívá také intenzivní transport včel a rozšíření hematofágního roztoče *Varroa destructor*, který je vektorem včelích virů.

V diagnostice virových chorob včel byly tradičně používány metody elektronové mikroskopie a zejména rychlá a relativně levná metoda imunodifúze v agarovém gelu, která je ovšem limitována dostupností antisér. V současné době je nejčastěji používanou diagnostickou metodou reverzně-transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR). Přestože má tato metoda mnohá omezení, představuje spolu se sekvenční analýzou virového genomu, ale také tradičními diagnostickými metodami významný nástroj pro studium virů včel.

Tato práce byla finančně podporována projektem MŠMT AdmireVet č. CZ1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01).

Literatura:

^aRyba, S., Titěra, D., Schodelbauerova-Traxmandlova, I., Kindlmann, P. 2012. Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia*, Section Zoology. 67:590-595.

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@kzcr.eu

QF-PCR A DETEKCE MOZAIK V PRENATÁLNÍ DIAGNOSTICE

Čejnová V., Harmaš V., Wilimská M., Stará M., Soukupová M., Laštůvková J.

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

Trizomie chromozomů 13, 18, 21 a aneuploidie chromozomů X a Y jsou zodpovědné za 95% chromozomálně podmíněných vrozených vývojových vad. QF-PCR (kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce) představuje metodu vhodnou k rychlé a spolehlivé diagnostice těchto nejčastějších chromozomálních aneuploidií z mikrokvant fetálních buněk bez nutnosti jejich kultivace. Metoda je založena na principu kvantitativní PCR a na typizaci chromozomů tzv. STR (*short tandem repeats*) markery. Tyto sekvence DNA jsou značeny fluorescenčně a jsou prezentovány polymorfismy sekvencí mikrosatelitní DNA. STR markery jsou rovnoměrně rozprostřeny po všech chromozomech, jejich kombinace je unikátní pro každého jedince a dědí se z rodičů na potomky.

Spolehlivost metody QF-PCR pro detekci mozaik je stále diskutabilní. Dle literatury lze pomocí QF-PCR identifikovat mozaicismus od úrovně 15% a vyšší, přičemž schopnost této metody zachytit mozaikové zastoupení dvou či více buněčných linií ve vzorku, nezávisí jen na stupni mozaiky, ale také na zúčastněných chromozomech. Autoři prezentují tři případy prenatálního záchyty mozaicismu s využitím molekulární metody QF-PCR. V jednom případě se jedná o mozaikovou formu autozomální trizomie a u dvou případů o detekci gonozomální mozaiky. Ve všech třech případech byl nález z QF-PCR ověřen chromozomálním vyšetřením a stupeň mozaiky byl popřípadě upřesněn pomocí molekulárně cytogenetické metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace).

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



cobas[®]
Life needs answers

<http://www.roche-diagnostics.cz>



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, ačkoliv 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 hrHPV.³

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 ML, et al. Am J Clin Pathol 2011; 135:466-475.
© 2012 Roche Molecular Systems, Inc. All rights reserved. COBAS is a trademark of Roche.
Roche Molecular Diagnostics, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94568 USA <http://hpv16and18.com>

cobas[®] | The cobas[®] HPV Test
KNOW THE RISK





O NAŠICH PRODUKTECH VÍME VŠE

JSME ČESKÝ VÝROBCE S DLOUHOLETOU TRADICÍ

Garantujeme kontrolu nad celým procesem vývoje, výroby a distribuce všech nabízených GeneProof souprav

- náš tým odborníků má mnohaleté zkušenosti s PCR
- garantujeme nadstandardní zákaznický servis a expresní dodávky
- zajišťujeme interní kontrolu kvality dle mezinárodních standardů
- dosahujeme vynikajících výsledků v panelech externího hodnocení kvality QCMD, INSTAND e.V., SZÚ
- průběžně inovujeme produkty na základě nejnovějších poznatků molekulární biologie a požadavků zákazníků

ASCO MED s.r.o.

ASCO-MED, spol. s r. o.

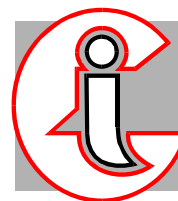
Pod Cihelnou 6/664, 161 00 Praha 6

tel.: +420 233 313 578

fax: +420 233 313 582

e-mail: asco@ascomed.cz

<http://www.ascomed.cz>



INNOGENETICS

BIOTECHNOLOGY FOR HEALTHCARE

 **BAG** HEALTH CARE

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](http://www.bag-healthcare.cz)

Bio-Consult Laboratories spol.s r.o.
je přední česká distribuční firma,
která je na trhu od roku 1993
a specializuje se na dovoz
produktů z oblasti molekulární
biologie a genetiky pro vědu
a výzkum (Life Science)
i klinickou diagnostiku.



Bio Consult
LABORATORIES

věda & výzkum
www.bioconsult.cz
since 1993



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

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



kontakt

RNDr. David Valík

Tel.: +420 602 340 576

Fax: +420 283 932 507

E-mail: david.valik@bmgrp.cz

<http://www.biomedica.cz/>

Společnost BIOMEDICA ČS, s.r.o. se zabývá distribucí produktů pro medicínu (humánní i veterinární), farmaceutický průmysl, vědu a výzkum a produkci potravin. Produkty pro laboratoře tvoří významnou část produktového portfolia společnosti. V oblasti in-vitro diagnostiky jsme partnerem laboratoří, které se zabývají vyšetřováním alergií, autoimunitních onemocnění, endokrinologií, sérologií infekčních onemocnění, mikrobiologií, hemostázou a v neposlední řadě molekulární diagnostikou. V oblasti molekulární diagnostiky zastupujeme mezinárodní společnosti, které nabízejí produkty pro laboratoře infekční diagnostiky, imunogenetiky, cytogenetiky a molekulární patologie.

Schoeller Pharma Praha s.r.o. nabízí už 20 let široký sortiment spotřebních materiálů a pomůcek z různých plastů především pro použití v oblasti lékařských a přírodních věd, IVF, molekulární biologií, výrobě biologicky aktivních látek atd.

- **NOVĚ** Reagencie pro molekulární biologii: Izolační a purifikační kity, produkty na Endpoint PCR / RT – PCR / qPCR, horizontální a vertikální gelovou elektroforézu, nukleotidy a další enzymy
- **KVALITNÍ** výrobky s maximální homogenitou výrobků uvnitř šarže i mezi šaržemi a s náročnou výstupní kontrolou

Schoeller Pharma Praha s.r.o.

Jihočeská 514/8

148 00 Praha 4

Tel.: +420 261 009 161

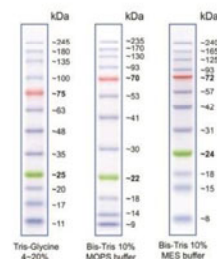
Fax: +420 261 009 162

IČ 496 81 541

DIČ CZ 496 81 541

mail@pharma.cz

<http://www.pharma.cz/>



Nabízíme také široký sortiment laboratorních přístrojů a pomůcek včetně servisních služeb. Od roku 2005 udržujeme a úspěšně absolvujeme dozorové a recertifikační audity SYSTÉMU MANAGEMENTU KVALITY ČSN EN ISO 9001:2009.

Více na <http://www.instruments.cz/>





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

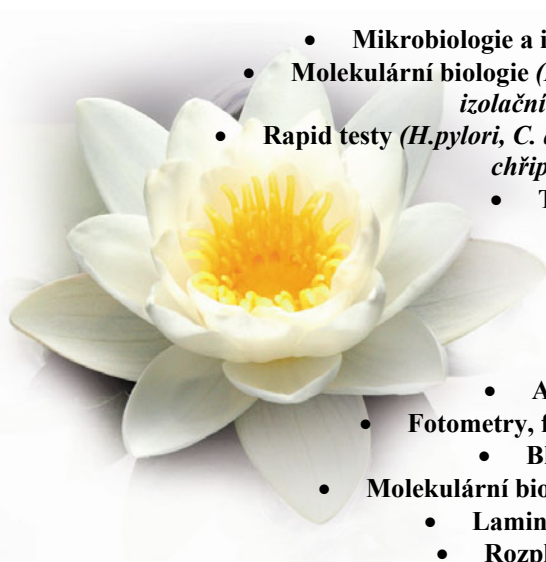
- Mikrobiologie a imunologie (*ELISA, imunofluorescence, bloty*)
- Molekulární biologie (*Real Time PCR i endpoint PCR, hybridizace, RFLP, izolační soupravy, obecné reagensie a pufry*)
- Rapid testy (*H.pylori, C. difficile, E.coli EHEC, O157, Campylobacter, Strep A, chřipka A/B, RSV, adenoviry, rotaviry*)
 - 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



ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.

Náměstí Svobody 18

602 00 Brno

Tel.: +420 542 213 851

Fax: +420 542 213 827



Elisabeth Pharmacon pro vás vyrábí a dodává...

- DNA diagnostika EliGene® a EliTech
- Přístroje ZEPHYRUS® - PCR boxy, biohazard boxy
- Přístroje pro automatickou izolaci DNA / RNA
- Soupravy pro izolaci DNA / RNA
- Mastermixy a polymerázy
- Příprava oligonukleotidů a sekvenování
- Spotřební materiál pro laboratoře (rukavice, plast atd.)



Nakupujte v našem e-shopu
a zapojte se do našeho
bonusového programu
pro věrné zákazníky

www.elisabeth.cz | www.eligene.com | www.zephyrusbsb.com

Novinky:
EliGene® HBV (CE 1023)
EliGene® HCV (CE 1023)



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>

Firma GeneTiCa s.r.o. dodává osvědčené real-time PCR diagnostické soupravy výrobců:

Institute of Applied Biotechnologies a.s.

pro diagnostiku genetických mutací :FII, FV, FXII, FXII, BF a A1298C, C677T

STD: Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum, Ureaplasma spec., Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Gardnerella vaginalis a Trichomonas vaginalis
Lidský Papilomavirus, Mycoplasma pneumoniae a Chlamydia pneumoniae

Altona Diagnostics GmbH

Adenoviry, lidské herpes viry a polyomaviry:

Adenovirus, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Herpes simplex 1 a 2, Varicella zoster, lidský herpes virus 6A,6B, alfa Herpes virus 1 a 2 a VZV, BK virus, JC virus

Respiratorní viry :

Adenovirus, Influenza A, B a H1N1, Metapneumovirus,A,B, Parainfluenza virus 1-4, a Respiratory Syncytial virus

Enteroviry a bakterie:

Lidský Adenovirus, Norovirus group I a II, Clostridium difficile toxin I a II, Shiga toxin 1 a 2 a ipaH



česká biotechnologická společnost se zaměřením na:

- výrobu **oligonukleotidů** a **real-time PCR sond**
- vývoj a výrobu **molekulárních diagnostik** v medicíně
- vývoj a výrobu biotechnologických produktů včetně **OEM produkce**
- molekulárně-genetické testování
- molekulárně-biologické analýzy při pre-klinickém a klinickém testování léčiv (**CRO**)

Systémy kvality generi biotech:
ISO 9001, ISO 13485, ISO 17025

generi biotech, s. r. o | Machkova 587, 500 11 Hradec Králové, Česká republika

www.generi-biotech.com

LAB MARK a.s.

Pod Cihelnou 532/23
161 00 Praha 6 - Ruzyně

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



Dodavatel klinické diagnostiky a molekulární biologie. Nabízíme reagenty, biochemikálie, protilátky, kontroly SERO, NGAL, ELISA, PCR, Real-Time PCR kity, barvičky GelRed a GelGreen a celou řadu produktů z oblasti molekulární biologie a klinické diagnostiky a laboratorních plastů. Z nabídky přístrojů se specializujeme na lab. přístroje jako jsou např. pipety, centrifugy, přístroje pro izolaci DNA/RNA, RT-PCR cykly, nebo mikroobjemové spektrofotometry DeNovix. Kromě řady kvalitních produktů nabízíme servisní a aplikační služby, kalibrace a validace přístrojů. Klademe důraz na osobní přístup a flexibilitu. Máme krátké dodací lhůty a dokážeme se operativně přizpůsobit požadavkům zákazníků. Současně provozujeme e-shop, kde si naši zákazníci mohou zakoupit veškeré produkty z naší nabídky za zvýhodněné ceny oproti standartní katalogové nabídce.

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

MEDISTA spol. s r.o.
U krčské vodárny 939/1a
140 00 Praha 4



Tel.: +420 241 444 525, +420 241 444 637, +420 241 444 668
Fax: +420 241 445 980
E-mail: medista@medista.cz
Web: <http://www.medista.cz>
Zákaznická podpora: servis@medista.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



Společnost MGP se specializuje již přes dvacet let na distribuci radiochemických produktů jak pro diagnostické, tak výzkumné účely. V dnešní době ale MGP nabízí již celou škálu produktů z oblastí molekulární biologie a klinické diagnostiky. V naší nabídce najdete kromě reagentů, ELISA a RIA kitů, protilátek a laboratorních plastů také drobné laboratorní přístroje špičkové kvality, mezi něž patří hlavně spektrofotometr NanoDrop. Klademe důraz zejména na osobní přístup, flexibilitu a podporu při hledání nových alternativních produktů.

PentaGen s.r.o.

Rooseveltova 1609
272 01 Kladno

+420 602 441 331

info@pentagen.cz



PentaGen dováží a distribuuje výrobky pro laboratorní diagnostiku se zaměřením na oblast genetiky, onkologie, infekční diagnostiky a farmakogenomiky. V naší nabídce nechybějí nejmodernější diagnostické metody, jako jsou array CGH nebo QF PCR, ale i FISH próby a testy metylace onkogenů. Dodáváme i produkty pro in vitro fertilizaci včetně vitrifikace. Důraz klademe na rychlou, profesionální a individuální podporu laboratoří při užívání našich produktů. Našimi zákazníky jsou především nemocnice, soukromé diagnostické laboratoře a IVF centra.

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

**TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.**

Křížíkova 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

**Sipoch, spol. s r.o.**

Felbabka 4, 268 01 Hořovice
tel/fax: 257 325 340/ 257 318 481

sipoch@sipoch.cz

www.sipoch.cz



Výhradní zastoupení Gilson v ČR a SR. Pipety, dávkovače, magnetické míchačky, automatické pipetovací stanice, automatizovaná příprava vzorků SPE, GPC, prepLC, čerpadla, HPLC, ventily, spojovací komponenty LC, úpravy a výroba přístrojů a příslušenství, autorizovaný servis Gilson.

Exclusive representation of Gilson in the Czech Republic and Slovakia. Pipettes, dispensers, magnetic stirrers, automated pipetting station, automated sample preparation SPE, GPC, prepLC, Pumps, HPLC, valves, connecting components LC, production and modifications instruments and accessories, authorized service Gilson.

Zastoupené firmy: GILSON, 2MAG, IDEX, RHEODYNE, UPCHURCH, ISMATEC, ILS, BIOCHEM-FLUIDICS