



RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN



PROGRAM A SBORNÍK KONFERENCE

Pardubice, 7. - 8. února 2018

www.rank.cz



RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN

PROGRAM A SBORNÍK KONFERENCE RANK 2018

RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN
MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝMI TECHNIKAMI

7. a 8. února 2018
v prostorách hotelu Zlatá Štika, Pardubice

ISBN 978-80-87436-12-7

OBSAH

Zajištění konference 4

PROGRAM KONFERENCE

Celkový program konference 5

SBORNÍK

Abstrakty přednášek 9

Abstrakty posterů 39

Firemní inzerce 53



ZAJIŠTĚNÍ KONFERENCE

POŘADATELÉ

Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP
MeDiLa spol. s r.o., Štrossova 239, 530 03 Pardubice

SPOLUPRÁCE

Univerzita Pardubice, FChT, Katedra biologických a biochemických věd

ODBORNÝ GARANT KONFERENCE

Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

ORGANIZAČNÍ VÝBOR KONFERENCE

Ing. František Štumor, Ph.D. - předseda

Prof. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

PharmDr. Lenka Plíšková

RNDr. Jaroslav König

Mgr. Margita Bartková

Ing. Barbara Štumrová

Mgr. Eliška Kročová

Šárka Novotná

PROGRAM KONFERENCE



STŘEDA 7. ÚNORA 2018

- 10:00 – 12:30 **Registrace**
- 13:00 – 13:15 **Zahájení**
- 13:15 – 14:15 **Úvodní sdělení**
Prof. RNDr. Julius Lukeš, CSc., Parazitologický ústav AV ČR
Lidský mikrobiom a eukaryom – už nikdy sami (60 min)
- 14:15 – 14:30 **Přestávka**
- 14:30 – 15:45 **Analýza humánního genomu I.**
Mgr. Lucie Roubalová, OKB FN Olomouc
Screening kolorektálního karcinomu pomocí detekce hypermetylované DNA V2 oblasti genu pro Septin9 v plazmě (25 min)
RNDr. Jana Němcová, Ph.D., Biomedicínské centrum, Plzeň
Přínos molekulárně biologických metod pro screening análního karcinomu u rizikové populace v České Republice (25 min)
Doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D., LF UK Plzeň
Prediktivní význam miR-34a, miR-224 a miR-342 u pacientů s pokročilým karcinomem plic a ceRNA hypotéza (25 min)
- 15:45 – 16:00 **Přestávka**
- 16:00 – 17:15 **Analýza humánního genomu II.**
Mgr. Halina Šimková, PŘF UK Praha
Bayesovská interpretace DNA dat hydatifonních mol a nonmolárních triploidů (25 min)
Mgr. Pavel Trubač, Nemocnice České Budějovice a.s.
Přestavby genů pro TCR a IgH aneb klony útočí (25 min)
Mgr. Zuzana Čapková, Ústav lékařské genetiky, FN Olomouc
Detekce vrozených mutací u onkologických pacientů technikou digitální MLPA (25 min)
- 17:15 – 17:30 **Přestávka**
- 17:30 – 18:30 **Varia**
RNDr. Martin Krestanpol, Ph.D., QIAGEN GmbH, Hilden, SRN
HPV screening - nové přístupy (30 min)

RNDr. Maria Müllerová, CSc., Citylab s.r.o., Praha
Přeshraniční migrace a kontrola šíření možné tuberkulózy (30 min)

19:30 – 23:00 **Společenský večer a posterová sekce**

ČTVRTEK 8. ÚNORA 2018

- 8:30 – 9:00 **Úvodní sdělení**
RNDr. Pavel Hložek, GeneProof a.s., Brno
Molekulární mikrobiologie a genetika - Klinická praxe ve stínu technologie (30 min.)
- 9:00 – 9:50 **Spalničky**
MUDr. Lenka Petroušová, Ph.D., Klinika infekčního lékařství, FN Ostrava
Spalničky – klinické zkušenosti z epidemie v Ostravě (25 min)
Mgr. Michaela Kantorová, Zdravotní ústav, Ostrava
Epidemie spalniček v Moravskoslezském kraji – zkušenosti s laboratorní diagnostikou (25 min)
- 9:50 – 10:05 **Přestávka**
- 10:05 – 11:25 **Rutinní detekce virů**
RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D., VÚVeL, v.v.i., Brno
Jaké genotypy rotavirů aktuálně cirkulují na našem území? Epidemiologická studie a genetická analýza lidských rotavirů A (25 min)
MVDr. Petr Václavek, Ph.D., SVÚ Jihlava
Africký mor prasat v ČR: možnosti laboratorní diagnostiky (35 min)
Mgr. Tomáš Prát, Ph.D., GeneProof a.s., Brno
Molekulární diagnostika herpetických outsiderů: HHV-6A/B a HHV-7 (20 min)
- 11:25 – 11:40 **Přestávka**
- 11:40 – 12:20 **Detekce bakterií**
Ing. Lucie Vondráková, Ph.D., VŠCHT Praha
Vliv mechanismu usmrcení bakterií na přesnost kvantifikace pomocí EMA/PMA-qPCR (20 min)

Ing. Martina Kračmarová, VŠCHT Praha
Změny půdní mikrobiální diversity v závislosti
na různém typu hnojení (20 min)

12:20 – 12:30 **Přestávka**

12:30 – 13:30 **Multiplexní detekce patogenů**

Mgr. Nikol Reslová, VÚVeL, v.v.i., Brno
Optimalizace MOL - PCR pro multiplexní detekci
patogenů (20 min)

Mgr. Veronika Huvarová, VÚVeL, v.v.i., Brno
Vývoj a aplikace MOL-PCR pro detekci původců
bakteriálních infekcí z potravin (20 min)

Mgr. Lucie Škorpíková, VÚVeL, v.v.i., Brno
Rozlišení osmi druhů parazitických hlístic rodu Trichinella
s využitím High Resolution Melting (HRM) analýzy (20 min)

13:30 – 13:45 **Závěr, vyhlášení výsledků soutěže o nejlepší práci**

ABSTRAKTY PŘEDNÁŠEK

Abstrakty jsou řazeny do bloků přednášek v časovém sledu.
Na začátku sekce je uveden seznam přednáškových bloků.

SEZNAM PŘEDNÁŠKOVÝCH BLOKŮ

1. Analýza humánního genomu I.
2. Analýza humánního genomu II.
3. Varia
4. Spalničky
5. Rutinní detekce virů
6. Detekce bakterií
7. Multiplexní detekce patogenů

Prof. RNDr. Julius Lukeš, CSc.

Biologické centrum AVČR
Branišovská 31
370 05 České Budějovice

tel: +420 387 775 403

e-mail: jula@paru.cas.cz

Lidský mikrobiom a eukaryom – už nikdy sami

Lukeš J.

Institute of Parasitology, Biology Centre, and Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, and Canadian Institute for Advanced Research, Toronto, Canada.

We know for a long time that each human body hosts a multitude of microbes, which actually outnumber human cells. Within the last decade a huge amount of data has been amassed mostly thanks to next generation sequencing that provides compelling evidence for a major impact of the consortia of viruses (viriome), bacteria (microbiome) and eukaryotes (eukaryome) on our health. In my talk I will give an overview of the impact of microbiome, the by far best studied consortium, on human health and will also discuss various interesting aspects of this overlooked "organ". Finally, I argue that eukaryotes found in human intestine, until now usually considered as parasites, are in fact in many cases commensals with beneficial effects.

Mgr. Lucie Roubalová

Oddělení klinické biochemie
Fakultní nemocnice Olomouc
I.P.Pavlova 6, 779 00 Olomouc

tel: +420 588 444 794
e-mail: lucie.roubalova@fnol.cz

Screening kolorektálního karcinomu pomocí detekce hypermetylované DNA V2 oblasti genu pro Septin9 v plazmě

²Roubalová L., ¹Sychra P., ¹Procházka V., ¹Konečný M., ³Zapletalová J.

¹II. Interní klinika – gastro-enterologická a hepatologická FNOL a LF UP Olomouc

²Oddělení klinické biochemie FNOL

³Ústav lékařské biofyziky LF UP Olomouc

Klíčová slova: Septin 9, hypermetylace, kolorektální karcinom, adenom, screening
Kolorektální karcinom je druhé nejčastější nádorové onemocnění v České republice a i přes velký pokrok v diagnostice i terapii představuje celospolečenským problémem. Stávající screening kolorektálního karcinomu pomocí stanovení okultního krvácení ve stolici pořád není optimální. Proto neustále probíhá výzkum nových biomarkerů vhodných pro časnou diagnostiku. Jedním ze slibných biomarkerů je detekce hypermetylované DNA V2 oblasti genu pro Septin9 v plazmě. Cílem naší studie bylo vyhodnotit senzitivitu a specifitu Septinu9 a jeho možné využití jako screeningového testu. Provedli jsme stanovení Septinu9 v plazmě u 108 pacientů pomocí Epi proColon Plasma Quick kitu metodou Real-time PCR. Všichni pacienti před odběrem krve podstoupili kolonoskopii a výsledky byly použity jako referenční metoda. Byla stanovena senzitivita a specifita testu v našich klinických podmínkách. V souboru 108 osob byl kolonoskopicky zjištěn u 41 osob adenom, u 21 osob karcinom a 46 osob mělo negativní kolonoskopický nálezn. V kategorii osob s negativním kolonoskopickým nálezem byl Septin9 u 34 negativní, u 2 pozitivní, u 10 osob nebylo možno test vyhodnotit pro nízkou koncentraci DNA v izolátu (ND). V kategorii pacientů s prokázaným adenomem byl Septin9 ve 26 případech negativní, v 1 pozitivní a u 14 osob byl výsledek ND. Ve skupině pacientů s karcinomem byl Septin9 negativní u 7 osob, pozitivní u 7 osob, u dalších 7 osob byl test hodnocen ND. Zjištěná senzitivita testu pro predikci karcinomu nebo adenomu byla 19,5%, specifita 94,4%. Pozitivita testu Septin 9 byla signifikantně častější u osob s karcinomem než u osob s adenomem, nebo s negativním kolonoskopickým nálezem ($p=0,003$). Výsledky ukázaly, že specifita testu je dobrá, ale při nízké senzitivitě. Test byl bohužel zatížen nízkou výtěžností DNA v izolátu při použitím způsobu izolace na magnetických částicích. Téměř třetina vyšetření nemohla být vyhodnocena.

RNDr. Jana Němcová Ph.D.

Biomedicínské centrum
Lékařská fakulta UK v Plzni
Alej Svobody 1655/76, 323 00 Plzeň – Severní Předměstí

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

Přínos molekulárně biologických metod pro screening análního karcinomu u rizikové populace v České Republice

^{1,2,3}Němcová J., ^{1,2}Černá K., ^{4,6}Šmahelová J., ⁵Hercogová J., ⁵Rob F., ^{1,2}Ondič O.

¹Šiklův ústav patologie, FN Plzeň

²Bioptická laboratoř

³Biomedicínské centrum lékařské fakulty v Plzni

⁴Národní referenční laboratoř pro papilomaviry a polyomaviry

⁵Dermatovenerologické oddělení 2. LF UK v Praze a nemocnice Na Bulovce

⁶Katedra genetiky a mikrobiologie, PŘF Karlovy univerzity, Praha

Anální karcinom (AK) patří mezi malignity se stoupající incidencí, a to zejména ve specifických populacích HIV pozitivních mužů majících sex s muži (MSM). Většina maligních análních lézí je indukována dlouhodobou persisterencí HR-HPV viru v análním epitelu a vyvíjí se přes identifikovatelná prekancerotická stádia. Analogicky k modelové HPV indukované malignitě, karcinomu děložního hrdla, je možné detekovat a odstranit tyto prekancerózní anální léze a tím předcházet vzniku invazivně rostoucího karcinomu.

Mezinárodní společnost pro anální neoplázie (IANS) doporučuje jako nejpřínosnější vyšetření pro identifikaci análních intraepiteliálních neoplázií těžkého stupně (HSIL) anoskopii s vysokým rozlišením. Toto vyšetření je však finančně i personálně v ČR nedostupné, proto byl doposud prováděn screening AK pomocí cytologické analýzy stěru anální sliznice. Nedostatkem anální cytologie je poměrně nízká citlivost i specifita vyšetření. Cílem naší studie je zvýšit úspěšnost cytologického screeningu AK za použití molekulárně genetických a mikrobiologických metod, jako tomu je v případě screeningu biologicky podobných, HPV asociovaných lézí na děložním hrdle.

V příspěvku bychom rádi shrnuli poznatky z prvního roku 4leté studie podpořené grantem MZ, kdy na souboru 50 HIV pozitivních MSM provádíme analýzu cytologie stěru anální sliznice odebraného do tekutého media a ze zbytkového materiálu provádíme genotypizaci HPV virů, detekci transkripčně aktivní infekce pomocí mRNA HPV testu a analýzu metylačního umlčení několika tumor supresorových genů spojených s progresí a persisterencí HPV infekce v epitelu.

Doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Lékařská fakulta UK v Plzni
Ústav biologie
Alej Svobody 76, 323 00 Plzeň

tel: +420 377 593 261
e-mail: martin.pesta@lfp.cuni.cz

Prediktivní význam miR-34a, miR-224 a miR-342 u pacientů s pokročilým karcinomem plic a ceRNA hypotéza

^{4,5}Pešta M., ¹Kulda V., ²Svatoň M., ³Mukenšnabl P., ^{1,2}Hrdá K., ⁴Dvořák P., ⁴Houdek Z., ⁴Houfková K., ¹Vrzáková R., ¹Babuška V., ²Pešek M.

¹Ústav lékařské chemie a biochemie, ²Klinika pneumologie a ftizeologie, ³Šiklův ústav patologie, ⁴Ústav biologie, ⁵Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, 301 66 Plzeň, Česká republika

Anotace: Karcinom plic je celosvětově nejčastějším typem rakoviny s vysokou mírou úmrtnosti, incidence v České republice v roce 2011 byla 86,9 případů u mužů a 38,0 u žen na 100 000 osob. Přibližně 85% všech případů rakoviny plic je nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC). MikroRNA (miRNA) mají pro svou patofyziologickou roli a stabilitu v biologických vzorcích potenciál stát se cennými prediktivními markery pro nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC). Vzorky bioptické tkáně tvoří vhodný materiál pro profilování miRNA s cílem předpovědět účinek paliativní chemoterapie.

MikroRNA jsou malé nekódující molekuly RNA, které se podílejí komplexně na post-transkripční regulaci genové exprese včetně regulačních sítí ceRNA (competing endogenous RNA). Lidský genom kóduje více než 2500 miRNA, které regulují přibližně 60% genů. Mnoho studií popsalo zapojení miRNA do procesu karcinogeneze, progresu nádoru, vývoje metastáz. Stejně tak byl popsán vztah exprese miRNA k prognóze a účinků léčby u mnoha typů rakoviny.

V naší studii byla zkoumána skupina 81 pacientů (74 mužů a 7 žen, všichni kuřáci nebo bývalí kuřáci). Pacienti podstoupili paliativní chemoterapii na bázi platinových derivátů v kombinaci s paclitaxelem nebo gemcitabinem. Expese 17 vybraných miRNA byla měřena pomocí reverzní transkripce a kvantitativní polymerázové řetězové reakce v nádorové tkáni makrodisekované z formalinem fixovaných parafinem zalitých (FFPE) vzorků. Pro predikci účinku paliativní chemoterapie byl zkoumán vztah mezi hladinami exprese genů a dobou přežití (OS). Ze 17 vybraných miRNA byla nízká hladina miR-342 a vysoké hladiny miR-34a a miR-224 spojené s kratší dobou přežití (OS). Použitím clusterové analýzy byly identifikovány souvislosti mezi hladinami exprese miR-34a, miR-224 a miR-342 a přežitím pacienta. Clusterová analýza ukázala, že pacienti s vysokou hladinou exprese miR-224 a miR-342 měli podobnou prognózu jako pacienti s nízkou hladinou miR-224 a miR-342, která byla významně horší ve srovnání s pacienty s vysokou hladinou miR-224 nebo miR-342 a nízkou hladinou druhé miRNA.

Pro interpretaci těchto výsledků bude zřejmě nutné vyjít z úvahy, že efekt dané miRNA

nezávisí jen na její samotné hladině, ale je též ovlivněn hladinou jiné/jiných miRNA případně dalších transkriptů vytvářející společnou regulační síť. Tato myšlenka je podstatou tzv. ceRNA hypotézy, která bude při přednášce diskutována. Uvedená zjištění zároveň upozorňují na komplikovanost stanovení prognózy či predikce léčby založených pouze na jednotlivých molekulách miRNA jako markerech. Přesnější odpovědi na klinickou otázku by mohlo být dosaženo kombinací více vzájemně souvisejících molekul miRNA než pouze pomocí jednotlivých miRNA.

Práce byla podpořena projektem Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy SWV 2017 260693 a projektem FN Plzeň 00669806.

Mgr. Halina Šimková

Plch 19

533 45 Opatovice nad Labem

tel: +420 603 497 499

e-mail: halina.simkova@gmail.com

Bayesovská interpretace DNA dat hydatiformních mol a nonmolárních triploidů

^{1,2,4}Šimková H., ^{4,5}Fürst T., ^{4,5,6}Drábek J., ^{3,5,6}Putzová M.

¹Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

²1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy

³2. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy

⁴4BIN - centrum pro bayesovskou inferenci

⁵Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého

⁶Bioptická laboratoř s. r. o.

Gametogeneze i následná fertilizace mohou být zatíženy celou řadou chyb, jež vedou ke vzniku geneticky nestandardních, aberantních zygot. Mezi nimi zvláštní skupinu tvoří zygoty s poruchami počtu kompletních chromozomálních sad, přičemž nejčastěji se lze setkat s případy unipaternální diploidie, digynické či diandrické triploidie a tetraploidie. Tyto aberantní produkty početí jsou po určité, někdy i velmi dlouhou dobu schopny dělení a diferenciaci, takže stav se zpočátku klinicky manifestuje jako běžné těhotenství, a teprve později jsou v rámci preventivně diagnostických vyšetření zachyceny známky patologie.

Unipaternální diploidie vede k rozvoji patologicky organizovaného trofoblastu, označovaného jako kompletní hydatiformní mola, bez přítomnosti embrya. Rovněž u diandrické triploidie je trofoblast částečně hydatiformně organizován, embryo však bývá založeno, leč s mnohačetnými malformacemi. U digynické triploidie nemá trofoblast hydatiformní povahu a embryo je rozvinuto, rovněž ale s řadou charakteristických patologií. Žádný z uvedených stavů nejen že nedává naději na porod životaschopného plodu, ale nadto je hydatiformní povaha trofoblastu (zejména u kompletních mol) spojena s významným rizikem vzniku choriokarcinomu, a proto jsou taková těhotenství vždy indikována k ukončení.

Diferenciální diagnostika zahrnuje jak vyšetření ultrazvukové, tak následně histologické, cytologické a genetické, přičemž pouze posledně jmenované je schopné podrobně identifikovat mechanismus chyby, která ke vzniku aberace vedla. Touto chybou může být selhání meiózy jako takové, nondisjunkce v prvním meiotickém dělení, nondisjunkce ve druhém meiotickém dělení, dispermie, „diovie“, endoreduplikace či – extrémně vzácně – kombinace uvedeného. Rozlišit mezi těmito potenciálními příčinami je možné na základě analýzy většího počtu variabilních DNA lokusů (nejčastěji typu STR či SNP), srovnání zjištěných alelických patternů aberantního produktu početí s genotypy maternálního a paternálního původce (neboli „rodičů“) a konstruování věrohodnostních poměrů (Bayesových faktorů, LR) pro všechny dvojice možných hypotéz o příčině vzniku patologie. Získané věrohodnostní poměry jsou následně kombinovány s příslušnými prevalencemi (tedy apriorními

pravděpodobnostmi) jednotlivých patologií, čímž jsou získány aposteriorní poměry pravděpodobností těchto patologií. Užití bayesovského přístupu umožňuje dokonce často dosáhnout solidní diagnostické hodnoty analýzy i v případech, kdy vzorek jednoho z biologických původců (nejčastěji muže) není k dispozici.

Na uvedenou diferenciální diagnostiku lze následně navázat rovněž bayesovsky pojatou evaluací paternity a/nebo maternity, jež najde své uplatnění v případech, kdy aberantní produkt početí vzešel z mravnostního kriminálního deliktu (pohlavní zneužívání, znásilnění apod.).

Mgr. Pavel Trubač

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

tel: +420 387 873 021

e-mail: trubac@nemcb.cz

Přestavby genů pro TCR a IgH aneb klony útočí

¹Trubač P., ²Lukuczová S., ¹Scheinost O.

¹Laboratoř molekulární biologie a genetiky, Nemocnice České Budějovice a.s.

²Patologické oddělení, Nemocnice České Budějovice a.s.

Jedním z nástrojů molekulární biologie, které napomáhají v upřesnění diagnózy a určení prognózy lymfoproliferativních onemocnění, je analýza genů kódujících řetězce imunoglobulinů (Ig) a genů kódujících T- buněčný receptor (T-cell receptor, TCR). Geny kódující těžké řetězce pro Ig a TCR se skládají z několika genových segmentů (V, D, J, C). Tyto geny nejsou děděny v definitivní podobě, ale jsou vytvářeny v průběhu zrání lymfocytů, kdy je příslušný gen skládán náhodným přeskupováním tzv. rearrangementem těchto segmentů.

Za fyziologického stavu vykazuje délka přeskupených genů pro IgH a TCR velkou variabilitu, která odpovídá tzv. polyklonalitě, tedy přítomnosti velkého počtu buněčných populací s odlišnými přestavbami, díky kterým mohou lymfocyty reagovat na celou škálu antigenních struktur. Například v případě maligní transformace nacházíme monoklonální populaci, tedy klon maligní buňky, u kterého došlo v důsledku ztráty kontroly nad buněčným dělením k nekontrolovatelnému množení, a všechny takto vzniklé buňky nesou přestavbu o shodné délce.

Kromě přeskupování genových segmentů podléhá B-lymfocyt po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech tzv. somatickým hypermutacím variabilní části těžkého řetězce imunoglobulinu (IgVH). Této skutečnosti se využívá v případě stanovení mutačního statusu, který slouží jako významný prognostický marker u CLL.

Na několika případech poukážeme na to, jak může být obraz klonality ovlivněn imunologickou odpovědí při probíhající virové infekci a jak lze dále využít podrobnější typizaci klonů.

Analýza klonality lymfocytů je důležitým nástrojem v diagnostice lymfoproliferativních onemocnění a ačkoliv identifikace monoklonální populace je významný marker malignity, vždy je třeba uvědomit si fakt, že mohou existovat benigní proliferace, které mají reaktivní původ. Detailnější charakterizace přestavby imunoglobulinového řetězce (tedy zjištění jeho DNA sekvence) pak může být užitečným pomocníkem při molekulárně genetické charakterizaci nádorů.

Mgr. Zuzana Čapková

Fakultní nemocnice Olomouc
Ústav lékařské genetiky
I. P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc

tel: +420 585 853 718
e-mail: zuzana.capkova@fnol.cz

Detekce vrozených mutací u onkologických pacientů technikou digitální MLPA

¹Čapková Z., ²Janíková M., ¹Štefeková A., ¹Čapková P.

¹Fakultní nemocnice Olomouc a Univerzita Palackého v Olomouci, Ústav lékařské genetiky

²Fakultní nemocnice Olomouc a Univerzita Palackého v Olomouci, Ústav lékařské genetiky a Ústav klinické a molekulární patologie

Vrozené mutace v tumorsupresorových genech jsou jednou z příčin vedoucích ke zvýšenému riziku nádorového onemocnění. Digitální MLPA Hereditary Cancer Panel 1 (D001-025R, MRC-Holland) v kombinaci se SALSA digitalMLPA reakčním kitem (DRK01-IL, MRC-Holland) a SALSA Barcode Plate pro platformu Illumina (BP01-IL, MRC-Holland) je semi-kvantitativní metoda pro stanovení relativního počtu kopií stovek sekvencí DNA v genech MUTYH, EP-CAM, MSH2, MSH6, BARD1, MLH1, BAP1, MTF, APC, PMS2, NBN, CDKN2A, BMPR1, PTEN, ATM, CDK4, POLE, BRCA 2, SCG5/GREM1, PALB2, CDH1, TP53, RAD51D, BRCA1, RAD51C, BRIP1, SMAD4, STK11 a CHEK2. Delece cílové sekvence se projevuje relativním poklesem počtu čtení odpovídající sondy a naopak. V této studii jsme testovali 48 vzorků DNA izolovaných z periferní krve a indikovaných ke genetickému vyšetření vrozených mutací vybraných tumorsupresorových genů. U 48 vzorků DNA bylo nalezeno 5 pozitivních výsledků: duplikace v genu BRCA1 (exon 24), delece v genu BRCA1 (exon 21-22), duplikace v genu BRCA2 (exon 18), duplikace v genu PMS2 (exon 15) a duplikace v genu BMPR1A (exon 13). Nálezy v genech BRCA1 a BRCA2 byly ověřeny metodou standardní MLPA (P002, P077, MRC-Holland). Zbylé výsledky budou ověřeny nezávislou metodou. Závěrem lze říci, že technologie digitální MLPA může být použita jako samostatný test zaměřený na cílenou detekci genů daných příslušnou sestavou nebo jako doplněk cíleného sekvenování nové generace. Avšak negativní výsledek této metody nevyklučuje přítomnost mutace mimo příslušné oblasti.

Tato práce vznikla za podpory MRC-Holland b.v.

RNDr. Martin Krestanpol, Ph.D.

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 407 24 Hilden
Spolková republika Německo

tel: +420 724 222 410
e-mail: martin.krestanpol@qiagen.com

Host methylation: new biomarkers for management of women with positive results in HPV DNA screening

Krestanpol M.

QIAGEN

Cervical cancer is nearly 100% preventable through early detection of precancer before the disease becomes a danger to a patient's life or reproductive health. The cervical cervix screening programs are based on the cytology or, recently, on the hrHPV DNA testing that is more sensitive but less specific in the detection of CIN2+ compared to cytology. Primary HrHPV DNA testing in cervical cancer screening requires triage to distinguish women with clinically relevant disease (CIN 2/3+) from those with transient HPV-infection. Presently, cytology at baseline and 6 months or HPV 16/18 genotyping are used as triage tests.

Recently, it has been shown that hypermethylation of the tumour suppressor genes FAM19A4 and/or miR124-2 indicates the presence of cervical precancer or cancer. DNA methylation is generally a biochemical process that is important for normal development in higher organisms (1). It involves the addition of a methyl group to the 5th position of the pyrimidine ring of the cytosine nucleotide. Abnormal patterns of DNA methylation also play a major role in carcinogenesis. Host-cell promoter methylation analysis specifically detects cancers and so-called "advanced" cervical intraepithelial neoplasia (CIN) lesions, which harbour a cancer-like methylation profile and have a high short-term risk of progression to cancer (2,3,4).

Host methylation test QIASure examines promoter hypermethylation in bisulfite-converted DNA isolated from cervical specimens using a multiplex real-time PCR test. Positive results correlate with the presence of carcinogenic cells and advanced transforming CIN lesions.

In clinical trials, QIASure testing was performed on physician-collected cervical specimens from 258 hrHPV-positive women including 117 without evidence of CIN 2 or worse after 18 months follow-up (CIN \leq 1), 42 with CIN 2, 30 with CIN 3, 50 with squamous cell carcinoma, and 10 with adenocarcinoma. QIASure detected 100% of carcinomas (squamous cell carcinoma and adenocarcinoma) in these samples, but varied in detection of other grades of CIN, from 88.9% in CIN 3+ to lower sensitivity for CIN 1/2. FAM19A4 and miR124-2 methylation analysis specifically detects advanced transforming CIN lesions. CIN 2/3 with low levels of FAM19A4 and miR124-2 methylation have low short-term progression risk for cancer. These patients can be managed by close surveillance rather than treated.

Independent research from leading cervical cancer scientists confirms the effective use of FAM19A4/miR124-2 methylation analysis for detection of cervical carcinomas and advanced CIN 2/3 lesions (5-10). In a subgroup of women over 30 years (n=287), the CIN 3+

sensitivity and specificity for FAM19A4 methylation (88.3% and 62.1%) was greater than that of cytology (85.0% and 47.6%) and HPV 16/18 genotyping (70% and 57.7%) (10). DNA methylation analysis of FAM19A4/miR124-2 has an equal performance and high sensitivity for identifying high-grade CIN and cervical cancer in hrHPV positive brush- and lavage-collected self-samples.

In conclusion, QIASure is an accurate triage test to see beyond HPV for clinical assurance that the patient has no short-term risk of cervical cancer.

1. Costello, J.F., and Plass, C. (2001). *J. Med. Genet.* 38, 285–303.
2. De Strooper, L.M., et al., (2014). *Cancer Prev. Res.* 7, 1251–7.
3. Bierkens, M. et al. (2013). *Int. J. Cancer* 133, 1293–9.
4. Steenbergen, R.D.M. et al. (2014). *Nat. Rev. Cancer* 14, 395–405.
5. De Strooper, L.M., et al., (2014). *Cancer Prev. Res.* 7, 1251–7.
6. De Strooper, L.M., et al. (2014). *J. Clin. Pathol.* 67, 1067–71
7. De Strooper, L.M., et al. (2016). *Int. J. Cancer* 138, 992–1002.
8. De Strooper, L.M., et al. (2016). *Gynecol. Oncol.* 14, 341–7.
9. Bierkens, M. et al. (2013). *Int. J. Cancer* 133, 1293–9
10. Luttmmer, R., et al. (2015). *Int. J. Cancer* 138, 992–1002.

RNDr. Maria Müllerová, CSc.

CITYLAB spol. s r.o.,
Seydlerova 2451/8, 158 00 Praha 5 – Stodůlky
detašované pracoviště: Pod Marjánkou 1906/1, 169 00 Praha 6

tel: +420 773 759 514, +420 602 204 434

e-mail: maria.mullerova@citylab.cz

Přeshraniční migrace a kontrola šíření možné tuberkulózy

Müllerová M.

CITYLAB spol. s r.o.

Tuberkulóza (TB) je stále závažné infekční onemocnění staré jako lidstvo samé, postihuje populaci celého světa. TB je v posledních letech trvale v popředí zájmu World Health Organisation (WHO), podléhá povinnému hlášení ohledně výskytu. Téměř třetina světové populace je TB infikována. Z těchto závažných epidemiologických důvodů je TB WHO označena jako „globální ohrožení“. V České republice je situace v počtu nově hlášených případů a recidiv TB v posledních letech zatím příznivá, incidence kolem 5/100 000 obyvatel:

2012 - TB celkem 611 (552 dýchací ústrojí + 59 jiná), incidence 5,8

2013 - 502 (455+47), 4,8

2014 - 512 (461+51), 4,9

2015 - 518 (451+67), 4,9, z celkového onemocnění TB bylo 110 cizinců

2016 - 515 (446+69), 4,9, z toho 150 cizinců.

Migrace do Evropy kulminovala v roce 2015 a vedla ke zvýšení výskytu TB. To se může negativně projevit i v budoucnu v České republice. Západoevropské statistiky uvádějí, že až 30 % imigrantů jsou nemocní akutně či chronicky, včetně infekčních onemocnění. Doklady o zdravotním stavu ze zemí původu jsou nevalidní a nelze je použít pro odhad rizika, údaje dětí o očkování jsou neprůkazné. Zavlečení infekčních onemocnění a možnost šíření v komunitě imigrantů se vyskytuje celá řada běžně ale i méně běžně se vyskytujících onemocnění dětí i dospělých: TB, hepatitida A, B, C, E, HIV/AIDS, záškrt, černý kašel, spalničky, zarděny, příušnice, průjmová onemocnění i malárie. Tato onemocnění byla již diagnostikována v uprchlých a záchytných zařízeních ČR. Uprchlíká krize se na výskytu TB v ČR zatím neprojevila. Zdravotnické zařízení Ministerstva vnitra: „V roce 2015 se u námi kontrolovaných nelegálních migrantů či žadatelů o azyl objevila TB ve 3 případech, stejně tak i v dalším roce.“ Nejvíce případů onemocnění TB v ČR je v Praze, téměř čtvrtina ze všech nemocných. Jedná se o sociálně slabé jedince a cizince. V Německu v rámci migrace došlo k vzestupu počtu onemocnění TB i MDR formy zejména v roce 2015. Proto musíme být na podobnou situaci jako v Německu připraveni. V případě předpokládané tuberkulózní infekce v rámci migrantů je potřeba snížit riziko zavlečení nálezů. Použití odpovídající vyšetřovací metody, u všech skiagram hrudníku, krevní test QuantiFERON TB Gold-in-Tube, který odhaluje i latentní TB a mimoplicní formy. Doočkovat děti, pokud

se neprokáže přítomnost postvakcinační jizvy. U osob s respiračními problémy vyšetření sputa na M. tbc, použít rychlé laboratorní vyšetřovací metody, což jsou molekulárně biologické metody. Evropská migrační krize se zatím České republiky nedotkla, ale nesmíme se tímto nechat ukolébat a musíme být připraveni na případné zhoršení této situace. Je třeba používat stejný balíček vyšetřovacích metod, jak doporučuje WHO, což znamená: rtg hrudníku, QuantiFERON, nejvíce používaný QFN, který odhaluje vedle aktivní TB i latentní TB a mimoplicní formy TB. Při pozitivním testu QFN a u lidí s respiračními problémy vyšetřit sputum na TB za použití rychlých laboratorních vyšetřovacích metod, z nichž GeneXpert MTB/RIF je nejrychlejší a nejpřínosnější, za 2 hodiny určení M. tbc komplexu a rezistence na rifampicin. To potvrzuje i Dara M, de Colombani P, Petrova-Benedict R. et al. Minimum package for cross-border TB control and care in the WHO European region: a Wolfheze consensus statement. Eur Respir J. 2012 Nov;40(5):1081-90. Využití molekulárních metod v surveillance infekčních onemocnění je jednou z hlavních priorit evropského centra pro kontrolu nemocí (ECDC), kde je vybráno 13 infekčních onemocnění, z nichž MDR-TB je na předním místě.

RNDr. Pavel Hložek

GeneProof, a.s.
Václavská 119, 619 00 Brno

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

Molekulární mikrobiologie a genetika - klinická praxe ve stínu technologie

Hložek P.

GeneProof a.s.

Začínáme žít v době „informačního“ ráje. Máme stále více vědeckých dat, používané diagnostické metody jsou stále přesnější a přesnější, molekulární detekce jsou stále citlivější a citlivější ...

Na první pohled je logické, že veškerý přínos pokročilých a stále se zlepšujících technologií molekulární biologie vidíme jako jednoznačné pozitivum a tím patrně zůstane i v budoucnu.

Nezapomínáme ale stále častěji na to, že molekulární biologie a genetika je pouze nástroj, s pomocí kterého máme hledat odpovědi vedoucí ke správné diagnóze? Opravdu poskytují špičkové technologie dneška jednoduché odpovědi vedoucí k rychlé léčbě pacienta? Využíváme opravdu celý potenciál těchto metod dostatečně?

Jak jsou na tom ve skutečnosti naše klinické interpretační znalosti ve vztahu k velkému objemu a vysoké kvalitě získávaných dat?

Pokusme se ponořit společně do reálného světa, který občas přináší více otázek, než odpovědí a kde jedinou cestou hledání odpovědí asi vždy zůstane diskuse ...

MUDr. Lenka Petroušová, Ph.D.

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

tel: +420 597 374 255
e-mail: lenka.petrousova@gmail.com

Spalničky - klinické zkušenosti z epidemie v Ostravě

Petroušová L.

Fakultní nemocnice Ostrava, Klinika infekčního lékařství

Cíle: Zpracovat klinickou závažnost onemocnění spalniček během epidemie na Ostravsku.

Metody: Soubor pacientů hospitalizovaných v období od poloviny února do poloviny června se spalničkami na Klinice infekčního lékařství, spalničky byly potvrzeny metodou ELISA, KFR nebo přímo polymerázovou řetězovou reakcí.

Výsledky: První pacient na Klinice infekčního lékařství v Ostravě byl hospitalizován 14. 2. 2017. Během 4 měsíců bylo hospitalizováno celkem 95 pacientů. Nejmladší pacient měl 3 měsíce a nejstarší 54 let. Klinický průběh onemocnění u nenaočkovaných jedinců, kteří tvořily 40 % z celého souboru, byl plně vyjádřen. U osob, které měly aplikovanou jednu dávku vakcíny, byl také většinou zaznamenán plně rozvinutý obraz spalniček, na rozdíl od osob, které byly očkovány 2 dávkami vakcíny. U těchto pacientů byl průběh spalniček většinou mírný, mitigovaný, diagnóza byla stanovena často na základě epidemiologických souvislostí. U plně vyjádřeného průběhu onemocnění byly vysoké teploty, exantém, enantém, laryngitidy, bronchitidy a dehydratace. Nejzávažnější komplikací byla pneumonie, která se rozvinula u 12 pacientů (13 %). Jednalo se o pneumonie s výraznou dušností, která ustupovala pomalu, oxygenoterapie byla nutná 3-5 dnů. Další zaznamenané komplikace byly otitida (3 pacienti), gastroenteritida (7 pacientů), hepatopatie u dospělých pacientů (17 pacientů), myositida (1 pacient), septický průběh (1 pacient).

Závěr: Epidemie spalniček v Ostravě nás přesvědčila o stále trvajícím závažnosti onemocnění, zvláště proto, že není k dispozici cílená terapie. První účinná vakcína byla licencovaná na území USA v roce 1963. V České republice byla zahájena vakcinace v roce 1969 a očkovaly se děti narozené v roce 1968 starší 10 měsíců. Přes možnosti prevence zůstávají spalničky celosvětově významnou příčinou mortality i morbidity. K udržení dobré epidemiologické situace je nutná proočkovanost populace přes 95 %.

Mgr. Michaela Kantorová

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě
Partyzánské nám. 7, 702 00 Ostrava

tel: +420 596 200 241

e-mail: michaela.kantorova@zuova.cz

Epidemie spalniček v Moravskoslezském kraji – zkušenosti s laboratorní diagnostikou

Kantorová M., Mrázek J.

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum klinických laboratoří, Oddělení molekulární biologie

V roce 2017 byl zaznamenán vyšší výskyt onemocnění spalničkami v České republice. Ohnisko nákazy bylo v Moravskoslezském kraji, kde od února do června onemocnělo přibližně 130 osob. Spalničky (morbilli) patří k jedněm z nejnakažlivějších přenosných onemocnění. Diagnostikují se nejčastěji na základě typického klinického obrazu.

Laboratorní diagnostika spalniček je založena na detekci specifických protilátek ve třídách IgG a IgM. Serologické vyšetření se provádí v akutní fázi infekce, ale i po proděláním infekce. Kromě serologických metod provádíme přímý průkaz viru spalniček metodou real-time PCR. Z důvodu relativně krátké virémie je toto vyšetření vhodné zejména v časně fázi infekce (maximálně do 7 dnů od výsevu vyrážky).

V příspěvku budou zmíněny naše zkušenosti s laboratorní diagnostikou viru spalniček.

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

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

tel: +420 533 331 101

e-mail: prodelalova@vri.cz

Jaké genotypy rotavirů aktuálně cirkulují na našem území? Epidemiologická studia a genetická analýza lidských rotavirů A.

¹Prodělalová J., ¹Moutelíková R., ¹Dufková L., ²Dvořáková-Heroldová M.,
²Holá V., ³Sauer P.

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

²Mikrobiologický ústav FNUSA a LF MU Brno

³Ústav Mikrobiologie FNOL a LF UP Olomouc

Rod Rotavirus náleží do čeledi Reoviridae a zahrnuje nejméně 8 skupin (druhů) – RVA-RVH a dále RVI, který byl detekovaný v Maďarsku u psa a prozatím nebyl ICTV formálně uznán jako nový druh. Nejběžnějšími a nejlépe prostudovanými jsou RVA, které jsou také považovány celosvětově za nejdůležitějšího původce těžkých gastroenteritid u malých dětí; každoročně jsou příčinou více než 215 000 úmrtí u dětí mladších 5 let (více než 33 % všech úmrtí dětí následkem průjemových onemocnění).

Binární klasifikační systém, který je používán pro běžnou klasifikaci rotavirů, je založen na charakterizaci dvou hlavních povrchových virových antigenů – VP4 a VP7, které vyvolávají tvorbu specifických neutralizačních protilátek. Sekvence segmentu kódujícího protein VP7 zařazuje rotavirus do G-genotypu a sekvence segmentu kódujícího VP4 protein určuje P-genotyp. Genotypizace rotavirů je prováděna především pro výzkumné účely, nicméně přináší velmi cenné informace o zastoupení jednotlivých typů RVA v populaci, o změnách poměru genotypů v závislosti na prováděné vakcinaci a následně o účinnosti používaných vakcín a také o možné introdukci zoonotických kmenů rotavirů.

V průběhu naší studie bylo od března 2016 do listopadu 2017 vyšetřeno celkem 1059 vzorků lidských stolic, z nichž bylo 15,4 % (n=163) vzorků pozitivních na přítomnost RVA. Vzorky byly vyšetřovány třemi různými metodami (průkaz antigenu RVA pomocí EIA a imunochromatograficky a průkaz rotavirové dsRNA metodou RT-qPCR).

Dosud byly pomocí Sangerova sekvencování či NGS (next-generation sekvencování) stanoveny následující G-genotypy: G1 (n=23), G8 (n=7), G2 (n=5) a G3 (n=3). Genotypizace segmentu kódujícího VP4 protein zařadila typizované RVA do následujících P-genotypů: P[8] (n=30), P[4] (n=5) a P[9] (n=1). Poměrně častý nálezn G8 genotypu je překvapivý, jelikož tento genotyp bývá detekován v Evropě zřídka, častější je v asijských státech (Thajsko, Vietnam, Japonsko). Stejně tak genotyp P[9] nepatří mezi běžně detekované P-typy, je velmi pravděpodobné, že se v tomto případě jedná o potenciálně zoonotický kmen rotaviru A.

MVDr. Petr Václavek, Ph.D.

Státní veterinární ústav Jihlava
Oddělení virologie
Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

tel: +420 724 332 627
e-mail: vaclavek@svujihlava.cz

Africký mor prasat v ČR: možnosti laboratorní diagnostiky

Václavek P., Štěpánek O., Barták P.

NRL pro KMP a AMP, SVÚ Jihlava

Africký mor prasat (AMP), který byl počátkem léta 2017 zavlečen do České republiky, je nebezpečnou nákazou s významným dopadem na zemědělskou produkci. Do kategorie velmi nebezpečných nákaz se AMP řadí především z důvodu vysoké virulence, vysoké kontagiozity a schopnosti rychlého šíření v populaci prasat. Nebezpečnost AMP rovněž umocňuje skutečnost, že doposud neexistuje účinná vakcína.

Virus afrického moru prasat je jediným zástupcem rodu *Asfvirus* čeledi *Asfarviridae*. Primárně se vyskytuje na africkém kontinentu, kde je endemický v převážné části subsaharské Afriky včetně Madagaskaru. Genom viru obsahuje okolo 170–195 000 párů bází, kódujících více než 150 proteinů. Na základě analýzy sekvencí nukleotidů oblasti B646L genu (p72) je v současné době rozeznáváno 23 základních genotypů. Virus AMP, který se od roku 2007 rozšířil z Kavkazu přes Rusko až do východní Evropy, náleží ke genotypu II, jenž původně pochází z oblasti východní Afriky. Kmeny viru AMP cirkulující ve východní Evropě vykazují většinou vysokou virulenci a genetickou stabilitu, ale přenos do nového prostředí může podpořit genetickou variabilitu a tím i změnu virulence a následnou mortalitu. Pro potřeby molekulární epidemiologie postupně dochází k identifikaci nových genetických markerů umožňujících odlišení a sledování různých genetických variant.

Laboratorní diagnostika AMP zahrnuje dva okruhy testů: detekci a identifikaci viru (tzn. virových antigenů nebo virového genomu) a průkaz specifických protilátek pomocí sérologických testů. V současné době je k dispozici široká škála testů k průkazu viru AMP, mezi které patří izolace viru na tkáňových kulturách, hemadsorbční test, ELISA test na průkaz antigenu, přímý fluorescencenční test, různé varianty polymerázové řetězové reakce (PCR) i metoda izotermální amplifikace s rekombinantní polymerázou (LAMP). V posledních letech je pro diagnostiku AMP nejvyužívanějším virologickým testem real-time PCR (qPCR) a to pro vysokou senzitivitu, specifitu, rychlost i možnost kvantifikovat virovou DNA. Navíc možnost automatizace qPCR zvyšuje kapacitu laboratoře z hlediska počtu možných vyšetření a snižuje potencionální zkřížené kontaminace v testu. Součástí diagnostiky je rovněž genetická typizace a charakterizace izolátů viru AMP.

První případ AMP v ČR byl potvrzen v Národní referenční laboratoři pro AMP v SVÚ Jihlava dne 26. 6. 2017. Jednalo se o uhynulé divoké prase nalezené u Zlína. Od té doby bylo v rámci aktivní či pasivní surveillance (zastřelená resp. uhynulá prasata) vyšetřeno více než 10 000 zvířat a potvrzeno více než 150 pozitivních případů AMP u divokých prasat (konec listopadu). Všechny vzorky ze zamořené oblasti jsou testovány v NRL pro AMP v SVÚ Jihlava.

va. Pro laboratoř se jedná o velmi náročné období. Každodenní rutinní diagnostiku AMP, zejména PCR analýzu, si nelze představit bez využití automatizovaných platforem (robotů) jako např. různých systémů pro extrakci DNA. Molekulární charakterizace izolátů viru probíhá ve spolupráci s EU RL pro AMP v Madridu.

Mgr. Tomáš Prát, Ph.D.

GeneProof, a.s.
Vídeňská 119, 619 00 Brno

tel.: +420 543 211 679
e-mail: prat@geneproof.com

Molekulární diagnostika herpetických outsiderů: HHV-6A/B a HHV-7

Prát T.

GeneProof, a.s.

Lidské herpesviry 6A/B a 7 patří mezi málo probádané zástupce této čeledě, způsobující v dětství tzv. šestou nemoc (exanthema subitum) s následnou latencí. Zásadní význam mají tyto viry při reaktivaci u imunokompromitovaných pacientů, jedná se o nejčastěji a nejdříve se reaktivující viry v době imunosuprese po alogenní transplantaci kmenových buněk aj. Proto je citlivá, kvantitativní a rychlá molekulární diagnostika specifickými TaqMan sondami důležitým nástrojem pro zahájení léčby a zvládnutí infekce.

Ing. Lucie Vondráková, Ph.D.

VŠCHT Praha

Technická 3, 166 28 Praha 6

tel: +420 220 445 198

e-mail: von.tuhyk@gmail.com

Vliv mechanismu usmrcení bakterií na přesnost kvantifikace pomocí EMA/PMA-qPCR

Vondráková L., Pazlarová J., Demnerová K.

VŠCHT Praha

Přestože je metoda kvantitativní real-time PCR (qPCR) velmi účinným nástrojem pro identifikaci a kvantifikaci různých mikroorganismů, jednou jejích z hlavních nevýhod je neschopnost rozlišit původ detekovaného signálu (živé, mrtvé, či živé, ale nekultivovatelné VBNC buňky). Z tohoto důvodu tudíž hrozí reálný zisk falešně pozitivního výsledku detekcí mrtvých buněk, a naopak možné podhodnocení počtu buněk živých. Tato limitace není tak závažným problémem v případě kvalitativních analýz, kde je zjišťována pouze ne/přítomnost detekovaných mikroorganismů. Nicméně je-li metoda qPCR používána pro kvantifikaci živých infekčních agens, např. v kontrole potravin a potravním průmyslu všeobecně, pro testování účinnosti dezinfekčních látek, nebo pro přesné stanovení rizika, stává se tento nedostatek velmi významným. Naštěstí je v dnešní době možné zavést jistá opatření v podobě takzvané před-úpravy analyzovaného vzorku v kombinaci s následnou qPCR, které pomáhají zajistit co nejpřesnější analýzu živých cílových mikroorganismů v daném vzorku.

Asi nejčastěji využívaným řešením, které pomáhá redukovat tento problém, je ošetření analyzovaného vzorku pomocí DNA interkalačních barviv, jakými jsou např. ethidium monoazid (EMA), či propidium monoazid (PMA). Účinnost tohoto přístupu však závisí především na propustnosti buněčné membrány.

Proto byla v této práci provedena tzv. „zabíjecí studie“, pomocí které byl zhodnocen vliv několika technik inaktivace buněk s různými mechanismy působení na výsledky EMA/PMA-qPCR. Tři hlavní termotolerantní *Campylobacter* spp. představující celosvětově nejčastější původce lidské enteritidy (*C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari*) byly ve směsné suspenzi použity jako modelové organismy a inaktivovány panelem osmi letálních a jedním subletálním procesem. Ve studii byly zahrnuty takové mechanismy inaktivace, s nimiž se bakterie mohou běžně setkat během svého života (např. zpracování a skladování potravin, působení různých dezinfekčních látek a mechanických vlivů apod.). Výsledky této studie byly poté kvantifikovány pomocí dříve navržené multiplex EMA/PMA-qPCR specifické pro dané kampylobaktery. Ukázalo se, že efektivita qPCR, a tudíž i konečné výsledky kvantifikace, jsou silně ovlivněny nejen různými inaktivačními mechanismy, ale patrně byly i druhově specifické rozdíly. *C. lari* se jevil být nejvíce rezistentním druhem k EMA/PMA barvení, zatímco *C. coli* se zdál být nejcitlivějším. Výsledky „zabíjecí studie“ jasně ukazují, že technika před-úpravy vzorku pomocí těchto interkalačních barviv nemůže být slepě použita pro každou analýzu, aniž by se bral v úvahu možný způsob bakteriálního usmrcení.

Práce byla financována projekty podpory vysokoškolského výzkumu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České Republiky MŠMT č. 21/2012, MŠMT č. 21/2013, COST Action BacFood-Net FA1202 a GAČR 17-15936S.

Ing. Martina Kračmarová

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 3, 166 28 Praha

tel: +420 776 380 046

e-mail: kracmarm@vscht.cz

Změny půdní mikrobiální diversity v závislosti na různém typu hnojení

Kračmarová M., Stiborová H., Úhlík O., Strejček M., Demnerová K.

Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie

Aplikace hnojiv na zemědělskou půdu je již běžnou praxí za účelem zvýšení živin a tím i zlepšení produkce plodin. Jejich použití ovlivňuje také jiné vlastnosti půdy, jako jsou například její struktura, půdní vlhkost, úrodnost, pH a prvkové složení. Aplikací organických či minerálních hnojiv je zároveň ovlivňován půdní mikrobiom a jeho diversity. Nicméně změny, které mohou nastat v mikrobiálním společenství, nejsou zcela prozkoumány.

Mikrobiální diversity v půdě (obdělávané i neobdělávané) je komplikovaná a proměnlivá v závislosti na okolních podmínkách (aplikace hnojiv, lokalita, pěstba plodin, složení půdy apod.). Cílem práce je analýza mikrobiálních populací z experimentálních polí na čtyřech místech České republiky: Suchdol, Hněvčeves, Humpolec, Lukavec. Každé výzkumné pole bylo rozděleno na tři části, na kterých jsou již od roku 1996 cyklicky pěstovány brambory, pšenice a ječmen (vždy v tomto pořadí). Každá z těchto částí je oseta jinou plodinou, nicméně rotace těchto plodin na jednotlivých třetinách je zachována. Zároveň byly všechny tři části pole rozděleny do dalších 5 bloků, které jsou po celou dobu experimentu hnojeny různými druhy hnojiv: i) NPK minerální hnojivo (dávky N-P-K byly 330-90-330 kg/ha), ii) odpadové kaly (330 kg N/ha), iii) odpadové kaly (990 kg N/ha), iv) hnojem ze statků (330 kg N/ha), v) kontrola bez hnojení.

Metoda trojpolního systému pěstby plodin a aplikace několika různých druhů hnojiv umožňuje, po odběru vzorků, porovnat vliv této zemědělské praxe na složení mikrobiálního společenství v půdě. Již několik studií potvrdilo, že se mikrobiální diversity mění v závislosti na typu aplikovaného hnojiva, nicméně málokdy byly tyto studie dlouhodobé či kombinované s rotací plodin, která je běžně v zemědělství používána k udržení úrodnosti půd.

Ze všech výzkumných polí byly odebrány vzorky, ze kterých byla izolována DNA. Pomocí dvou po sobě následujících polymerázových řetězových reakcí byl amplifikovaný markerový gen 16S rRNA (V4 a V5 region). Následná sekvenace byla provedena ve spolupráci s univerzitou na Aljašce ve Fairbanks pomocí Illumina MiSeq.

Následnou analýzou rozptylu, kanonickou korespondenční analýzou či analýzou indikátorových organismů byl potvrzen signifikantní vliv různých typů hnojiv a trojpolního systému na mikrobiální diversity. Zároveň informace o složení půdního mikrobiomu byly vícerozměrnými statickými analýzami propojeny s enviromentálními proměnnými.

Autoři děkují za financování projektu č. 16-07441S Grantové agentuře České republiky.

Mgr. Nikol Reslová

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

tel: +420 5 3333 1614

e-mail: reslova@vri.cz

Optimalizace MOL-PCR pro multiplexní detekci patogenů

^{1,2}Reslová N., ^{2,3}Huvarová V., ^{2,3}Hrdý J., ¹Kašný M., ²Králík P.

¹Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno

²Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, Brno

³Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno

Soudobé možnosti na poli diagnostických a skrínigových metod i nadále zaznamenávají výrazné pokroky, avšak stále není k dispozici dostatečně komplexní a multiplexní aplikace, umožňující sjednocení stávajících postupů v jednoduchý a funkční celek.

Naše práce je v tomto směru zaměřena na vývoj metodiky s potenciálem pro rychlý a simultánní skrínig širšího spektra patogenů ve směsném vzorku. Kvalitativní analýza je založená na multiplexní oligonukleotidové ligaci-PCR (MOL-PCR) s adaptací na suspenzní detekční systém xMAP, využívajícího magnetických mikrosfér. Optimalizací reakčních podmínek jsme vytvořili ucelený protokol pro rychlou detekci medicínsky a klinicky významných virů, bakterií a parazitů, kontaminujících zejména potravinové zdroje. Jednotlivé systémy jsou v současné době testovány se zaměřením na funkčnost v multiplexu, přičemž cílem našich snah je vytvořit detekční panely uzpůsobené různým typům vstupních matric, jako např. zelenina/ovoce, maso, voda, stolice.

Výzkum byl podpořen z projektů MŠMT ČR (LO1218), Ministerstva zemědělství ČR (RO0516), Ministerstva vnitra ČR (VI20152020044) a institucionální podpory Masarykovy Univerzity (MUNI/A/1362/2016).

Mgr. Veronika Huvarová

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

tel: +420 533 331 614

e-mail: michna@vri.cz

Vývoj a aplikace MOL-PCR pro detekci původců bakteriálních infekcí z potravin

^{1,2}Huvarová V., ^{1,3}Reslová N., ¹Králík P.

¹*Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno*

²*Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno*

³*Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno*

Multiplexní oligonukleotidová ligační PCR (multiplex oligonucleotide ligation PCR assay = MOL-PCR) je jednou z metod využitelných pro detekci mikrobiálních patogenů. Umožňuje analýzu více typů markerů, jako jsou jedinečné sekvence, inserce, delece nebo jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) v jedné multiplexní reakci. Pro detekci specifické cílové sekvence je navrhován pár tzv. MOLigo sond. Každý pár MOLigo sond je specifický pro určitou cílovou sekvenci, ale všechny páry obsahují stejnou sekvenci pro nasedání univerzálních primerů. MOLigo sondy se připojují k cílové sekvenci a ligují během samostatného ligačního kroku, čímž vytvoří komplexní ssDNA, která slouží jako templát pro následnou amplifikaci za použití univerzálního páru primerů (jeden je fluorescenčně značený) během PCR. Jedna z MOLigo sond obsahuje i tzv. TAG, což je unikátní sekvence pomocí které PCR produkty hybridizují ke kuličce s kovalentně navázanou anti-TAG sekvencí. Každý set kuliček tak nese odlišnou anti-TAG sekvenci, komplementární k TAG sekvenci v MOLigo sondě a zároveň má odlišitelnou spektrální adresu danou kombinací červeného a infračerveného fluoroforu, kterými jsou polystyrenové kuličky naplněny. Celá reakce i následná analýza jednotlivých setů kuliček s navázaným PCR produktem probíhá v přístroji MAGPix napojeném na počítač. MOL-PCR byla optimalizována pro detekci původců bakteriálních infekcí z potravin, kterými jsou *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* subs. *enterica* a *Staphylococcus aureus*. Všestrannost MOL-PCR byla využita při jejich simultánní detekci.

Tato práce vznikla v rámci projektu Bezpečnostního výzkumu Ministerstva vnitra ČR VI 20152020044.

Mgr. Lucie Škorpíková

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

tel: +420 533 331 614

e-mail: skorpikova@vri.cz

Rozlišení osmi druhů parazitických hlístic rodu *Trichinella* s využitím High Resolution Melting (HRM) analýzy

^{1,2}Škorpíková L., ^{1,2}Reslová N., ¹Kašný M.

¹Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno

²Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, Brno

Hlístice rodu *Trichinella* (kmen Nematoda), patří mezi celosvětově rozšířené parazity tenkého střeva a buněk příčně pruhované kosterní svaloviny. Napadají více než sto druhů hostitelů, mezi kterými jsou zastoupeni savci, plazi i draví ptáci. Mnozí zástupci rodu *Trichinella* jsou původci zoonóz, přičemž u člověka způsobují závažné onemocnění nazývané trichinelóza, které bylo doposud dokumentováno v 55 zemích světa.

Obecně se zástupci rodu *Trichinella* dělí do dvou morfologických skupin podle schopnosti svalových larev vytvářet kolem sebe kolagenní pouzdro. Silné pouzdro tvoří šest druhů (T1 - *T. spiralis*, T2 - *T. nativa*, T3 - *T. britovi*, T5 - *T. murrelli*, T7 - *T. nelsoni*, T12 - *T. patagoniensis*) a tři další taxonomicky nedefinované genotypy (T6, T8 a T9). Tři druhy (T4 - *T. pseudospiralis*, T10 - *T. papuae* a T11 - *T. zimbabwensis*) toto pouzdro netvoří. Kromě rozdílů ve velikosti a v tvorbě kolagenních pouzder jsou jednotlivé druhy těchto hlístic morfologicky téměř nerozlišitelné.

Cílem práce bylo vyvinout metodu umožňující rozlišení jednotlivých druhů parazitických hlístic rodu *Trichinella*. K tomuto účelu byla zvolena High resolution melting (HRM) analýza – jednoduchá, rychlá a spolehlivá metoda sloužící k detekci genetické variability amplifikovaných DNA fragmentů bez nutnosti sekvenace.

Pro analýzu byl zvolen úsek mitochondriálního genu kódující podjednotku I oxidázy cytochromu C (COI), vyznačující se požadovanou konzervovaností nukleotidové sekvence v rámci druhu a zároveň variabilitou mezi blízkce příbuznými druhy hlístic. Testováno bylo celkem 37 vzorků DNA – 33 vzorků izolovaných ze svalových larev hlístic referenčních druhů (*T. spiralis* ISS3, *T. nativa* ISS10, *T. britovi* ISS2, *T. pseudospiralis* ISS13; ISS588, *T. nelsoni* ISS37, *T. murrelli* ISS35, *T. papuae* ISS572 a *T. zimbabwensis* ISS1029) a 4 „slepé“ vzorky získané z přírodní infekce prasete divokého.

Výstupem naší studie jsou druhově specifické křivky s konfidenčními intervaly vytvořené z křivek teplot tání DNA referenčních vzorků, které svým charakteristickým průběhem a tvarem umožňují jednoznačné odlišení osmi druhů hlístic rodu *Trichinella*. Všechny „slepé“ vzorky byly na základě vytvořených konfidenčních intervalů určeny jako *T. britovi*.

Tento výzkum byl podpořen projektem Masarykovy univerzity (MUNI/A/1362/2016), Ministerstvem zemědělství České republiky (RO0517) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LH12096, LO1218 a LD15056).

ABSTRAKTY POSTERŮ



SEZNAM PŘIHLÁŠENÝCH POSTERŮ

1. **Ing. Diliara Akhatova**, Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie „Víme, co jíme?“ aneb použití PCR v analýze masných výrobků
2. **MVDr. Lucie Dufková Ph.D.**, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. Diverzita lidských a prasečích rotavirových kmenů v České republice a jejich možný zoonotický potenciál
3. **Ing. Eliška Fialová**, Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie Ověřování přítomnosti inhibičního efektu u qPCR při analýze DNA
4. **Ing. Simona Lencová**, Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie Identifikace makrely obecné (*Scomber scombrus*) pomocí analýzy parvalbuminového genu
5. **Mgr. Kristýna Mezerová**, Ústav mikrobiologie, LF UP Olomouc Detekce markerů genotoxicity *E. coli* a jejich potenciál pro screening rizika spontánního kolorektálního karcinomu (CRC)
6. **Bc. Lucie Michalcová**, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd Kontaminace kontaktních čoček patogenními kvasinkami
7. **Mgr. Pavla Murasová**, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd Optimalizace přípravy DNA sondy na bázi zlatých nanočástic využitelné pro elektrochemické senzory
8. **Sylva Neradová**, Gymnázium Pardubice, Mozartova 449 Analýza dosud necharakterizovaného genu PHO15 patogenních kvasinek *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*
9. **Bc. Denisa Smělá**, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd Optimalizace značení oligo RNA a jejich využití k porovnání metod izolace miRNA z lymfatických nádorových buněk
10. **Ing. Kamila Zdeňková Ph.D.**, Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie Vliv kyseliny mléčné na transkripci genů tvorby biofilmu *Staphylococcus aureus*

Ing. Diliara Akhatova

VŠCHT Praha
Ústav biochemie a mikrobiologie
Technická 5, 166 28 Praha 6

Výzkumný ústav potravinářský Praha
Radiová 1285/7, 102 00 Praha 15

tel: +420 776 513 245
e-mail: diliara.akhatova@vscht.cz

„Víme, co jíme?“ aneb použití PCR v analýze masných výrobků

^{1,2}Akhatova D., ¹Zdeňková K., ¹Fialová E., ¹Kubica L., ¹Demnerová K.
¹VŠCHT Praha, ²Výzkumný ústav potravinářský Praha

Falšování potravin je stále aktuální problém. Maso a masné výrobky patří k nejdražším potravinám a proto spadají do kategorie nejčastěji falšovaných komodit. Jedním z běžných způsobů klamání zákazníků je náhrada jakostního druhu masa masem méně hodnotným a uvádění nesprávných údajů na etiketě výrobku. V současné době existuje velké množství metod umožňujících určení druhového původu masa, mezi něj patří molekulárně-biologické metody využívající analýzu DNA, které umožňují velice přesnou identifikaci živočišných druhů použitých při výrobě potravin.

V předkládané práci byly analyzovány vzorky masných výrobků, zakoupených v tržní síti České republiky. Ve studii byla úspěšně použita polymerázová řetězová reakce (PCR) pro identifikaci masa skotu, prasat, koní a drůbeže (kuře, kachna a krůta).

Pro kvalitativní stanovení obsahu masa ve výrobcích byla použita metoda multiplexní PCR. Pro detekci masa skotu, prasat, drůbeže a koně byly použity primery komplementární k úseku mitochondriální DNA kódující cytochrom b. Pro testování drůbežích výrobků byly použity primery specificky amplifikující interleukin II kuřete, kachny i krůty.

Pro kvantifikaci DNA vybraných druhů mas (hovězí, vepřové a kuřecí) v masných výrobcích byla použita metoda kvantitativní multiplexní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase (mqPCR). V mqPCR reakci byly použity primery v kombinaci s příslušnými hydrolyzačními sondamikomplementární k DNA kódující geny pro beta-aktin prasete, cyklickou-GMP-fosfodiesterasu skotu, kuřecí interleukin II a pro gen kódující myostatin, univerzální marker savců a drůbeže.

V některých případech byly nalezené rozpory v údajích uvedených na etiketě s výsledky provedených analýz.

Poděkování: Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20-SV/2017). Práce byla dále podpořena grantem MZe (NAZV) QJ1530272: Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba – spotřebitel.

MVDr. Lucie Dufková, Ph.D.

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

Tel: +420 533 331 137
e-mail: dufkova@vri.cz

Diverzita lidských a prasečích rotavirových kmenů v České republice a jejich možný zoonotický potenciál

¹Dufková L., ¹Moutelíková R., ¹Prodělalová J., ²Dvořáková-Heroldová M.,
²Holá V., ³Sauer P., ⁴Kamler J., ⁴Drimaj J., ⁴Plhal R.

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

²Mikrobiologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně

³Mikrobiologický ústav Fakulty zdravotnických věd Univerzity Palackého v Olomouci

⁴Ústav ochrany lesů a myslivosti, Lesnická a dřevařská fakulta Mendelovy univerzity v Brně

Rotaviry patří mezi nejvýznamnější původce virových gastroenteritid dětí do pěti let věku a obecně mláďat savců. Jsou přenášeny orofekálně. Rod *Rotavirus* je členěn do osmi druhů označovaných písmeny A (RVA) až H (RVH) a doposud oficiálně neuznané druhy RVI a RVJ. Genom rotavirů se skládá z 11 segmentů lineární dvouřetězcové RNA, které kódují šest strukturálních a pět nebo šest nestrukturních proteinů. Pro klasifikaci rotavirů jsou běžně využívány tři z těchto genomových segmentů: VP6 segment kódující skupinový antigen (tj. hlavní kapsidový protein) se využívá k zařazení rotavirů do jednotlivých druhů, VP4 a VP7 segmenty (kódují dva vnější kapsidové proteiny) se používají ke klasifikaci rotavirů do P a G genotypů.

Cílem prezentované studie bylo (1) detekovat rotaviry A, B a C ve vzorcích lidské stolice a výkalů domácích i divokých prasat, (2) provést genotypizaci detekovaných rotavirů a (3) stanovit případná rizika zoonotického přenosu rotavirů mezi lidmi a prasaty.

V letech 2014 až 2016 bylo vyšetřeno 360 vzorů stolice získané od pacientů s akutní virovou gastroenteritidou, 222 vzorků výkalů prasete domácího a 203 vzorků střevního obsahu prasete divokého. U vzorků pozitivních na přítomnost rotavirového genomu byly amplifikovány sekvence genů VP6, VP4 a VP7, které byly dále analyzovány. V průběhu studie jsme bohužel doposud nedetekovali žádný lidský RVC, jehož výskyt v ČR jsme předpokládali vzhledem k občasnému zachytu v okolních evropských zemích. U prasete domácího je RVC detekován běžně (20,7 %, n=46), podobně je tomu i u divokých prasat (12,8 %, n=26). Obdobně jsme nedetekovali ani lidský RVB, jehož výskyt na našem území není ovšem příliš pravděpodobný a který bývá spíše ojediněle detekován u prasete domácího. RVC jsou u prasat běžně detekovány u klinicky zdravých i průjmujících zvířat a jejich význam je proto z hlediska veterinární medicíny nejasný. RVA jsme detekovali ve 30 % vzorků lidské stolice (n=108), 51,8 % vzorků výkalů prasete domácího (n=115) a 2,5 % vzorků střevního obsahu prasete divokého (n=5). Významným zjištěním byla detekce čtyř kmenů (G4P[25]I1, G4P[6]I5, G11P[13]I5 a G5P[13]I5) pocházejících ze střevního obsahu prasete divokého, které jsou fylogeneticky příbuzné s lidskými i prasečími kmeny RVA. Lidské RVA jsou ve

srovnání s prasečími kmeny geneticky více konzervované. Naopak divoká prasata mohou i díky tomu, že se často pohybují v blízkosti lidských sídel, významně přispívat ke genetické variabilitě RVA a případně ke vzniku kmenů se zoonotickým potenciálem.

Studie byla financována projekty Ministerstva zdravotnictví ČR (16-29937A) a Ministerstva zemědělství ČR (RO0516).

Ing. Eliška Fialová

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Fakulta potravinářská a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie
Technická 5, 166 28 Praha 6

tel: +420 737 465 034

e-mail: fialovae@vscht.cz

Ověřování přítomnosti inhibičního efektu u qPCR při analýze DNA

^{1,2}Fialová E., ¹Zdeňková K., ¹Demnerová K.

¹VŠCHT Praha

²VÚRV, v.v.i.

Extrakce kvalitní DNA z matrice je klíčovým krokem pro analýzu vzorku využitím polymérazové řetězové reakce (PCR). Komplexní vzorky často obsahují mnoho látek, které jsou izolovány spolu s DNA a následně snižují účinnost její amplifikace v průběhu PCR. V předkládané práci byly porovnány tři metody izolace DNA: izolační metoda využívající cetyltrimetylamonium bromid (CTAB) dle normy ČSN EN ISO 21571, metoda využívající CTAB s přísadkou fenolu a izolace komerčním kitem NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel, Německo). U všech metod bylo nejprve zvaženo riziko přítomnosti inhibitorů ze známých chemikálií potřebných pro izolaci. Po provedení qPCR byla zjišťována reálná přítomnost inhibičního efektu při amplifikaci DNA extrahované z masa a olejnin. Kromě porovnání inhibičního efektu mezi izolačními metodami DNA byl testován také vliv přísadky různých koncentrací inhibitoru, roztoku NaCl, do reakční směsi. Přítomnost inhibičního efektu byla vyhodnocena na základě výpočtu efektivity amplifikační reakce a/nebo změny prahového cyklu (Ct). Dále byla analyzována křivka tání, která může poukázat na změnu PCR produktu (pravděpodobně v důsledku vazby inhibitoru).

Na základě porovnání koncentrace a čistoty izolované DNA, pracnosti izolačního postupu a vyhodnocení přítomnosti inhibičního efektu byla jako nejlepší pro izolaci DNA ze vzorků zvolena izolační metoda využívající CTAB dle normy ČSN EN ISO 21571. PCR analýza s použitím této DNA vykazovala nejvyšší efektivity reakce, která zároveň spadá do optimálního rozmezí efektivity PCR (90 – 110 %). Naopak nejhorší efektivity reakce vykazovala DNA izolovaná komerčním kitem.

Literatura:

ENGL, JRC-IHCP. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2011.

Poděkování:

Práce byla podpořena granty MZe (NAZV) QJ1530272: „Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba – spotřebitel“ a QK1720263: „PAPAVÉR - Diagnostické metody pro laboratorní kontrolu pravosti máku setého“.

Ing. Simona Lencová

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

tel: +420 728 892 299
e-mail: lencovas@vscht.cz

Identifikace makrely obecné (*Scomber scombrus*) pomocí analýzy parvalbuminového genu

Lencová S., Zdeňková K., Akhatova D., Demnerová K.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Falšování potravin je problémem již od dob, kdy se potraviny začaly vyrábět za účelem prodeje. Ryby a výrobky z nich jsou příkladem stále častěji falšovaných komodit, což vyústilo v potřebu nových efektivních a spolehlivých metod pro identifikaci jednotlivých rybích druhů.

Identifikace ryb byla dříve založena na hodnocení morfologických znaků, ovšem v případě rybích výrobků takové metody nestačí. S rychlým vývojem molekulárně biologických metod založených na polymerázové řetězové reakci (PCR) se ukázalo, že pro účel stanovení druhu ryb ve výrobku jsou tyto metody ideální. Jejimi nespornými benefity jsou zejména rychlost, citlivost, specifita, přijatelná cena analýzy. Vhodným genomovým markerem pro druhovou identifikaci ryb je díky své stavbě parvalbuminový gen. Pro návrh primerů s cílem druhové identifikace ryb byla vybrána oblast druhého intronu parvalbuminového genu, který má u ryb velmi rozdílnou strukturu.

Cílem této práce bylo navrhnout a ověřit protokol PCR pro identifikaci komerčně významné ryby makrely obecné (*Scomber scombrus*) založený na analýze sekvence genomové DNA hlavního rybiho alergenu parvalbuminu. Ze tří testovaných metod izolace DNA byla jako nejvhodnější zvolena CTAB dle ČSN EN ISO 21571. Dále byly navrženy a testovány primery cílené na amplifikaci specifických genů makrely obecné. Specifita primerů byla testována na panelu 31 živočišných druhů, konkrétně na DNA z 24 druhů ryb, šesti druhů masa běžně dostupného na tuzemském trhu a na lidské DNA. Využitelnost primerů pro reálné vzorky byla ověřena analýzou šesti výrobků s obsahem makrely obecné nebo lososa obecného. Navržené primery prokázaly značnou specifitu, amplifikace probíhala pouze u vzorku makrely obecné s produkty o velikosti 215 bp, čímž byla potvrzena vhodnost využití analýzy parvalbuminového genu pro druhovou identifikaci makrely obecné.

Mgr. Kristýna Mezerová

Ústav mikrobiologie, LF UP Olomouc
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

tel: +420 585 639 505

e-mail: mezerovak12@gmail.com

Detekce markerů genotoxicity *E. coli* a jejich potenciál pro screening rizika spontánního kolorektálního karcinomu (CRC)

¹Mezerová K., ¹Raclavský V., ¹Janovská L., ²Starý L.

¹Ústav mikrobiologie LF UP a FN Olomouc

²1. chirurgická klinika FN Olomouc

Vznik a rozvoj sporadického kolorektálního karcinomu (CRC) je multifaktoriální proces, na jehož etiologii se podle dosavadních publikací podílí také produkce mikrobiálních genotoxinů pocházejících ze střevní flóry. V řadě studií byl popsán kancerogenní účinek genotoxinu *kolibaktinu*, který může být produkován některými kmeny bakterie *Escherichia coli*. U producentů *kolibaktinu* byla prokázána schopnost indukovat dvouřetězcové zlomy DNA v eukaryotických buňkách *in vitro* a *in vivo*, což vede k inkompletním reparacím DNA a chromozomálním aberacím. Kolibaktin je kódován na genomickém ostrově *pks*, ten bývá přítomen u *E. coli* fylogenetické skupiny B2, u které lze detekovat širokou škálu genů kódující faktory virulence. Mezi další genotoxiny, u nichž byl popsán proonkogenní vliv a které by mohly být v budoucnu považovány za rizikové markery CRC, patří cytotoxický nekrotizující faktor (CNF) a cytoletální toxin (CDT).

Cílem našeho výzkumu je stanovení rizikových genetických markerů sporadického kolorektálního karcinomu pro budoucí screening tohoto onemocnění. Právě detekce *kolibaktinu* u enterobakterií izolovaných od pacientů s CRC představuje dle řady publikací v současné době perspektivní řešení pro časnou diagnózu onemocnění. Pozdější záchyt onemocnění v již pokročilém stadiu bývá častým důvodem selhání symptomatické léčby.

V naší studii byly vzorky odebírány metodou výtěru z rektu, který představuje nejjednodušší a neinvazivní metodu vyšetření. Kromě pacientů s CRC byla oslovena také kontrolní skupina pacientů se žádostí o poskytnutí vzorku za účelem porovnávání střevního mikrobiomu. Tu představují pacienti s jinou diagnózou než je CRC. Vzorky byly kultivovány na několika typech selektivních a selektivně-diagnostických půd pro co největší záchyt mikroorganismů. Následovala identifikace všech typů kolonií pomocí MALDI-TOF MS, subkultivace bakteriálních druhů potenciálně produkujících genotoxiny a jejich detekce pomocí PCR.

Ze 168 testovaných izolátů *E. coli* byl u 46 kmenů detekován genomický ostrov *pks* kódující *kolibaktin*. Při následné charakterizaci tohoto vybraného souboru *pks* pozitivních izolátů byl detekován u 28 kmenů gen kódující CNF a u 5 kmenů gen pro CDT. Na základě provedené biotypizace bylo zařazeno všech 46 zmíněných izolátů do fylogenetické skupiny B2. Vzhledem k tomu, že kmeny biotypu B2 jsou charakterizovány vysokou virulencí, bude tato skupina izolátů dále testována na přítomnost genů kódujících faktory virulence (*afaC*, *dsbA*, *fimH*, *htrA* a *lpfA*).

Předpokládaným výsledkem naší studie je validace genetických markerů pozitivně asociovaných s etiologií CRC, na základě kterých by byl rizikový pacient doporučen k dalšímu vyšetření a pravděpodobnost časného záchytu onemocnění by se tak zvýšila.

Bc. Lucie Michalcová

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

tel: +420 466 037 779
e-mail: st38503@student.upce.cz

Kontaminace kontaktních čoček patogenními kvasinkami

Michalcová L., Heidingsfeld O.

Patogenní kvasinky rodu *Candida* představují hrozbu pro jedince s oslabenou imunitou. U zdravých lidí mohou být tyto kvasinky součástí běžné mikroflóry, ale oslabení organismu může vést ke vzniku endogenní infekce. Zdroj infekce však může být také exogenní. Patogenní kandidy adherují i k abiotickým povrchům, např. k plastovým zdravotnickým potřebám. Časté jsou případy kolonizace zubních protéz, které vedou ke kandidózám ústní dutiny. Kandidy také ochotně kolonizují kontaktní čočky a následně způsobují endoftalmitidy.

Sledovali jsme kolonizaci hydrogelových kontaktních čoček kvasinkami *C. albicans*, *C. parapsilosis* a *C. glabrata* a dynamiku následného uvolňování patogenů z kontaminovaných čoček do čistého média. Zabývali jsme se metodami izolace kvasinkové DNA z kontaminovaných čoček, za účelem případné identifikace patogenů pomocí PCR.

Tato práce vznikla za finanční podpory Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, studentský projekt SGS_2016_004 a SG_20.

Mgr. Pavla Murasová

Univerzita Pardubice,
Fakulta chemicko-technologická,
Studentská 573, 532 10 Pardubice

tel: +420 466 037 793

e-mail: pavla.murasova@upce.cz

Optimalizace přípravy DNA sondy na bázi zlatých nanočástic využitelné pro elektrochemické senzory

Murasová P., Srbová J., Kovářová A., Korecká L., Bílková Z.

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

DNA-sonda je syntetizovaný oligo(deoxy)ribonukleotid s přesně definovanou délkou a sekvencí komplementární s cílovou (stanovovanou) molekulou DNA. Běžně užívané sondy v cytogenetických vyšetřovacích metodách bývají výše zmíněné oligonukleotidy konjugované nejčastěji s fluorescenční značkou, popřípadě radioaktivním izotopem a slouží především k průkazu genetických poruch v cytodiagnostice.

Oligonukleotidy konjugované s nanočásticemi např. zlaté nanočástice (AuNPs), magneticky aktivní nanočástice nebo kvantové tečky lze využít v mnoha moderních detekčních technikách. Kombinací vysoké specifity DNA oligonukleotidů a unikátních optických a fyzikálních vlastností zlatých nanočástic vzniká DNA sonda, kterou lze využít jako součást biosenzoru, například při průkazu patogenních bakterií v potravinách.

V závislosti na modifikaci oligonukleotidu a AuNPs lze využít pro jejich vzájemnou konjugaci různých typů kovalentní vazby. Jednou z nejčastějších vazeb je vazba mezi thiolovanými oligonukleotidy a molekulou zlata (Au-S vazba). Díky vysoké afinitě thiolové skupiny se zlatem vzniká velmi stabilní konjugát. Klíčové při funkcionalizaci zlatých nanočástic oligonukleotidy přes Au-S vazbu je fakt, že povrch zlatých nanočástic je záporně nabitý stejně tak jako celá molekula DNA, což vede ke vzniku odpuzivých sil. Tomu lze zabránit procesem postupného zasolování roztoku pomocí chloridu sodného během reakce. Rozhodující je i zvolený vazebný pufr a jeho pH, což je nutno optimalizovat.

V této práci jsme se zabývali optimalizací vazby thiolovaných oligonukleotidů na povrch zlatých nanočástic za pomoci 4 různých protokolů. Vedle Au-S vazby lze pro přípravu oligo-AuNPs biosenzoru využít zlaté nanočástice a oligonukleotidy s různými funkčními skupinami a kovalentně je provázat například pomocí karbodiimidové metody.

Výzkum byl podpořen Evropskou unií v rámci projektu LOVE-FOOD 2 MARKET, č. 687681.

Sylva Neradová

Gymnázium Pardubice - Mozartova
Mozartova 449, 530 09 Pardubice

tel: +420 602 893 768

e-mail: sylvanerad@seznam.cz

Analýza dosud necharakterizovaného genu PHO15 patogenních kvasinek *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*

Neradová S., Kročová E., Kupčík R., Heidingsfeld O., Janovská S., Bílková Z.
Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd

Kvasinky *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* patří k oportunním patogenům, které napadají osoby se sníženou imunitou. Kromě nepříjemných povrchových kandidóz, které jsou poměrně dobře léčitelné antimykotiky, také mohou způsobovat závažné vnitřní kandidózy tělesných tekutin a tkání. Geny PHO15 jsou nepopsané otevřené čtecí rámce, jejichž funkce jim je přiřazována na základě homologie s genem PHO13 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Ačkoliv jsou proteiny Pho15p i Pho13p anotovány jako alkalické fosfatázy, jejich aminokyselinová sekvence je řadí spíše do rodiny HAD enzymů. Naším cílem bylo jejich funkci experimentálně ověřit a dále tyto enzymy charakterizovat. Expresce proteinů probíhala v bakteriích *Escherichia coli* BL21(DE3) transformovaných vektorem pET28b, který obsahoval kódující sekvenci pro CaPho15p nebo CpPho15p. Fosfatázy se v buňkách ukládaly do inkluzních tělísek. Tyto inkluze byly z buněk izolovány, rozpuštěny v kyselině octové s pomocí sonikace a následně převedeny dialýzou do vody. Pro purifikaci fosfatáz byla použita afinitní chromatografie. Aktivitu stanovujeme kolorimetrickou metodou za použití para-nitrofenylfosfátu jako substrátu. Výsledky potvrdily, že se jedná o fosfatázy. Dále je nutné stanovit kinetické parametry tohoto chromogenního substrátu a zjistit, jaké další substráty CaPho15 a CpPho15 defosforylují.

Bc. Denisa Smělá

Univerzita Pardubice

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

tel: +420 773 692 755

e-mail: st42126@student.upce.cz

Optimalizace značení oligo RNA a jejich využití k porovnání metod izolace miRNA z lymfatických nádorových buněk.

Smělá D., Kročová E., Kupčík R., Bílková Z.

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

Molekuly miRNA patří mezi krátké RNA, které regulují genovou expresi na post-transkripční úrovni. Změna exprese miRNA může vést k patologii a je spojována s různými nádorovými onemocněními. Z tohoto důvodu jsou často analyzovány RT-qPCR či metodami sekvenování nové generace. Pro izolaci RNA z biologického materiálu se používají komerčně dostupné soupravy. Není proto běžné, že by výstupní kvalita vzorku byla kontrolována jinak, než stanovením celkové koncentrace RNA. Chceme-li se ale zaměřit na analýzu krátkých RNA molekul, měli bychom sledovat, s jakou účinností jsou izolovány. Rozhodli jsme se proto porovnat relativní výtěžnosti miRNA tří komerčně dostupných metod, lišících se principem izolace RNA. TRIzol™ Reagent je založen na fenol-chloroformové extrakci, díky které získáváme celkovou RNA. Fenol-chloroformovou extrakci využívá v kombinaci s extrakcí na pevnou fázi také *mirVana*™ miRNA Isolation Kit. *MirVana*™ nabízí možnost izolace jak celkové RNA, tak i RNA kratších než 200 nukleotidů. Další testovanou metodou byl *MagMAX*™ *mirVana*™ Total RNA Isolation Kit, který umožňuje získat celkovou RNA. Využívá k tomu extrakci na pevnou fázi, kterou jsou v tomto případě magnetické částice. Výchozím materiálem byly T a B-lymfatické nádorové linie JURKAT a RAJ1.

Srovnáním jsme zjistili, že pro izolaci miRNA je nejvýhodnější TRIzol™ Reagent, který poskytoval nejvyšší relativní výtěžnost. Největší ztráty v průběhu experimentu byly pozorovány u *MagMAX*™ *mirVana*™ Total RNA Isolation Kit.

Zvolené metody byly porovnány z hlediska relativní výtěžnosti oligo RNA, a proto byla k detekci vybrána elektroforetická separace se zaměřením na účinné dělení oligo RNA. Zde bylo nutné najít dostatečně citlivý systém detekce krátkých jednovláknových molekul. K otestování a optimalizaci byly vybrány tři možnosti barvení RNA – SYBR™ Safe, SYBR™ Green II a Toluidine Blue O. Jako nejlepší se pro vizualizaci oligo RNA jeví SYBR™ Green II, kterým byla detekována i oligo RNA dlouhá 10 nukleotidů. Ekonomičtější, avšak časově náročnější metodou je barvení roztokem Toluidine blue O. SYBR™ Safe je pro barvení oligo RNA nevhodný.

Ing. Kamila Zdeňková, Ph.D.

VŠCHT Praha

Technická 5, 166 28 Praha 6

tel: +420 774 228923

e-mail: kamila.zdenkova@vscht.cz

Vliv kyseliny mléčné na transkripci genů tvorby biofilmu *Staphylococcus aureus*

¹Zdeňková K., ¹Michalcová R., ¹Alibayov B., ²Kýřová V., ¹Purkrťová S.,
¹Demnerová K.

¹Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, FPBT, Ústav biochemie a mikrobiologie

²Státní zdravotní ústav v Praze, Centrum zdraví, výživy a potravin, Brno

Staphylococcus aureus je nebezpečným patogenem způsobujícím širokou škálu onemocnění. Stejně jako ostatní bakterie je kromě planktonního životního stylu schopen žít i přichycený k pevnému povrchu ve formě biofilmu. Biofilm poskytuje bakterii zvýšenou odolnost vůči nepříznivým podmínkám, jako je např. působení toxických látek či mechanických vlivů a jeho tvorba je tedy podmíněna vlastnostmi prostředí, ve kterém se bakterie nachází. Značným problémem je tvorba biofilmu v lékařství a potravinářském průmyslu.

Cílem této práce bylo zjistit, zda lze kyselinu mléčnou použít pro inhibici transkripce genů ovlivňujících tvorbu biofilmu bakterie *S. aureus*. Pro zjištění vlivu kyseliny mléčné na tvorbu biofilmu na úrovni transkripce byla izolována RNA z planktonických buněk a buněk biofilmu narostlého v průběhu 24 h kultivace v TSB médiu při 37 °C izolátů *S. aureus*. Izolace RNA byla provedena rovněž z buněk ošetřených 0,125 % kyselinou mléčnou (polovina stanovené minimální inhibiční koncentrace). Pro izolaci RNA byla použita komerční sestava RNeasy Mini Kit, s využitím protokolu modifikovaného v předkládané práci. Byla získána RNA poměrně vysoké kvality i kvantity, která byla ověřena spektrofotometricky a pomocí horizontální agaróзовé elektroforézy. Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA a použita pro PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase (qPCR). Cílem qPCR bylo stanovení relativní míry transkripce cílových genů účastnících se tvorby biofilmu izolátů *S. aureus*. Výsledkem byl zisk transkripčního profilu jednotlivých izolátů, pomocí něhož bylo zjištěno, že kyselina mléčná u většiny izolátů snižuje transkripci cílových genů a má tedy vliv nejen na tvorbu biofilmu, ale i na růst buněk volně se pohybujících v médiu.

Pomocí laserového konfokálního skenovacího mikroskopu byla vizualizována struktura biofilmu. V biofilmu, který byl kultivován v přítomnosti antimikrobiální látky, bylo přítomno menší množství buněk adheovaných k povrchu jamky mikrotitrační destičky ve srovnání s biofilmem tvořeným v nepřítomnosti antimikrobiální látky.

U všech testovaných izolátů byla rovněž zjišťována přítomnost 9 enterotoxinů (SEA-SEJ) pomocí PCR. Přítomnost *seg* byla prokázána u 6 izolátů, *seh* u 7 izolátů, *sei* u 5 izolátů, *sej* u 1 izolátu, *sea*, *seb*, *sec*^{hovězí} a *sed* a *see* nebyly u izolátů přítomné. Některé izoláty obsahovaly více, než jeden cílový úsek.

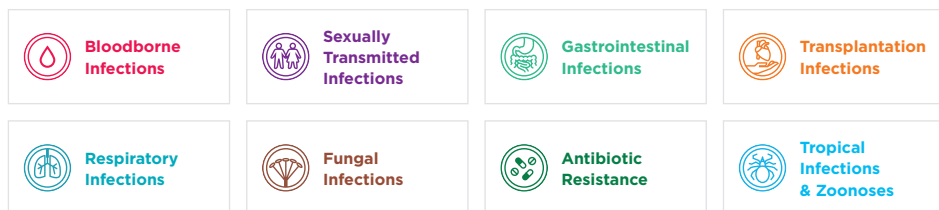
Poděkování: GA14-23597S: Působení environmentálních faktorů na destrukci biofilmů.

FIREMNÍ INZERCE



Molecular Diagnostics & Instruments

Microbiological Diagnostics ^{PCR Kits}



Genetic Diagnostics ^{PCR Kits}



Nucleic Acid Extractions



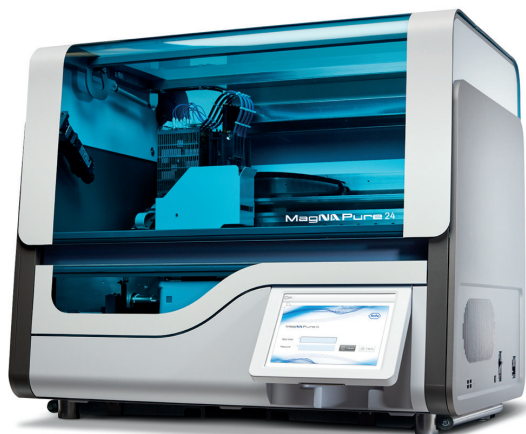
Instruments



MagNA Pure 24 Systém

Roche nastavuje nové standardy v izolaci NK

**Představujeme nový
automatický izolátor
genomické a cell-free
DNA.**



■ škálovatelné řešení automatické izolace od 1–24 vzorků ■ certifikované (CE-IVD) ■ propojitelné do LISu ■ možnost využít primární odběrové zkumavky ■ trekovatelné, intuitivní ■ vysoce efektivní a rychlé ■ již od 200 µl až do 4 ml ■ validované pro krev, plazmu, sérum, sputum, BAL, CSF, výtěr, moč, stolicí, čerstvou a zmraženou tkáň, FFPE ■

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

Objednávky

- E-mailem: objednavky@roche-diagnostics.cz
- Elektronická objednávka na:
<http://objednavky.roche-diagnostics.cz/objednavky/>

Centrum zákaznické podpory

- Tel: 800 11 11 99
- E-mailem: czech.rcsc@roche.com

Potřebujete-li více produktových informací, naleznete je na

- <https://lidsolutions.roche.com>
- <https://lifescience.roche.com>

MagNA Pure

The MagNA Pure 24 System including instrument, kits, and accessories are for in vitro diagnostic unless otherwise noted.

MAGNA PURE is registered trademarks of Roche. All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

© 2017 Roche Molecular Systems, Inc. All rights reserved.

METYLAČNĚ-SPECIFICKÝ REAL-TIME PCR TEST PRO PREDIKCI RIZIKA VÝSKYTU RAKOVINY DĚLOŽNÍHO ČÍPKU

„Výsledky vyšetření na gynekologii prokázaly přítomnost vysoce rizikového kmenu lidského papilomaviru, ale rakoviny děložního čípku se bát nemusíme.“

Pro koho?

Test je vhodný jako triáž pro pacientky s lehce abnormálním výsledkem cytologického vyšetření (ASC-US) či pro pacientky s prokázaným vysoce rizikovým typem papilomaviru (high-risk HPV/hrHPV).

Z jakých vzorků?

- ♦ stěry z děložního čípku
- ♦ stěry odebrané do roztoku pro cytologii v tekutém médiu (LBC – liquid-based cytology)
- ♦ vzorky odebrané samoodběrovou sadou

Princip a metodika

Na základě vědeckých studií byl prokázán vztah mezi hypermetylací promotorů tumor-supresorových genů FAM19A4 a hsa-mir124-2, a vyšším rizikem výskytu rakoviny děložního čípku. Průkaz hypermetylace tedy poskytuje přesnější informaci o rizikosti probíhající infekce HPV.

Izolace
a kvantifikace
DNA

Bisulfitová
konverze

Multiplex
real-time
PCR

Automatická
analýza
a interpretace
výsledků

cyklus
RotorGene Q Mdx

software
RotorGene Assay Manager

Informace o produktu

katalogové č. 616014

QIASure Methylation Test Kit 72 reakcí



DYNEX - VÝHRADNÍ DISTRIBUTOR PRO ČR A SR

DYNEX TECHNOLOGIES, spol. s r.o.

ČR: Lidická 977, 273 43 Buštěhrad, Česká republika

Tel.: +420 220 303 600, email: office@dynex.cz

SR: Nové Kalište 17, 974 04 Banská Bystrica, Slovenská republika

Tel.: +421 484 155 045, email: dynex@isternet.sk

www.dynex.cz





WEBLIMS – PŘÍSTUP DO LABORATOŘE V PROSTŘEDÍ INTERNETU

FONS Openlims - modul WebLIMS – poskytuje jednoduchou formou zabezpečený přístup k laboratorním výsledkům. Zároveň je možné ve stejném modulu vytvářet elektronické žádanky na laboratorní vyšetření. WebLIMS nevyžaduje žádnou instalaci na počítači uživatele. Je spustitelný v běžném internetovém prohlížeči. Přehledné uživatelské rozhraní umožňuje použití bez nutnosti školení.

WebLIMS je určen především pro ambulantní lékaře. Lze jej však využít i pracovníky laboratoře nebo nemocnice pro rychlý přístup k výsledkům v případech, že jsou mimo zařízení a mají k dispozici internetové připojení.

WebLIMS je internetová aplikace, která pracuje přímo s databází laboratoře. To umožňuje okamžitý přístup k patientským datům jak při vytváření elektronické žádanky (ověřené identifikační údaje), tak i při zobrazování výsledků. Výsledky lze zobrazovat průběžně od okamžiku, kdy jsou uvolněny laboratoří (validované výsledky).

PŘÍNOSY PRO UŽIVATELE

- ▶ Okamžité použití po přidělení přístupového hesla
- ▶ Snadný a okamžitý přístup lékaře k laboratorním výsledkům pacientů
- ▶ Intuitivní jednoduché uživatelské rozhraní
- ▶ Denní i kumulativní přehled výsledků vyšetření
- ▶ Vyšší efektivita práce lékaře a sestry při práci s laboratorními výsledky
- ▶ Přehledné tiskové výstupy
- ▶ Rychlé vytvoření elektronické žádanky
- ▶ Zabezpečený přístup k patientským datům
- ▶ Vyšší zabezpečení materiálu proti záměně při transportu
- ▶ Individuální přizpůsobitelnost pro konkrétní laboratoř
- ▶ Žadankové formuláře přizpůsobitelné konkrétnímu uživateli
- ▶ Možnost vlastního grafického vzhledu



OPEGEN A OLIGOGEN

pro detekci humánního a extrahumánního genomu
CeliacStrip, LactoStrip, B27 OligoGen, STDStrip



TENDIGO

INNO-LiPA
CFTR, HPV, HBV-genotypizace a testování citlivostí,



Agellgene pro fragmentovou analýzu

GenVinSet pro Real Time PCR

ASCO-MED, spol. s.r.o.
Pod Cihelnou 6/664
161 00 Praha 6

tel.: (+420) 233 313 578, - 582
www.ascomed.cz
asco@ascomed.cz

BAG HEALTH CARE

BAG Health Care GmbH nabízí řadu PCR diagnostik: **BAGene** - SSP typizace červených krvinek, **HISTO TYPE** - SSP typizace HLA alel. Pro náš automat **MR. SPOT®** dodáváme SSO testy **HISTO SPOT®** určené pro typizaci I. a II. HLA třídy, **HISTO SPOT® HLA AB Screen / ID** pro screening a identifikaci HLA protilátek a **ERY SPOT®** - SSO testy pro stanovení krevních skupin. Nedílnou součástí nabídky jsou i kontrolní testy, např. **CYCLER CHECK** pro kontrolu teplotní uniformity termocyklérů či **Wipe Test** pro kontrolu HLA kontaminací.

Dále nabízíme i velmi oblíbené soupravy pro průkaz predispozice k chorobám asociovaným s určitými HLA typy – **celiakie**, **narkolepsie**, **autoimunitní choroby** asociované s B27, nebo testy pro průkaz B51/B57. Všem našim zákazníkům pro snadnější interpretaci výsledků instalujeme zdarma pokročilý software **HISTO MATCH**. Pro rok 2018 chystáme kromě dalšího též uvedení real-time PCR testů pro HLA asociované choroby.

O této i další nabídce firmy naleznete více informací na našich webových stránkách.

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

tel.: 286 840 508
e-mail: info@bag-healthcare.cz
www.bag-healthcare.cz

O kompletně automatickém analyzátoru nukleových kyselin RT PCR, který je uživatelsky konfigurovatelný, už nemusíte jen snít....

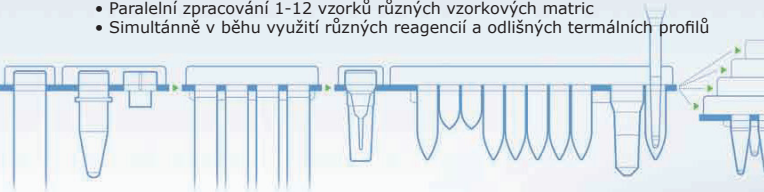


Úplná automatizace

- Automatická extrakce
- RT-PCR amplifikace
- Analýza výsledků

Bezkonkurenční flexibilita

- Paralelní zpracování 1-12 vzorků různých vzorkových matic
- Simultánně v běhu využití různých reagentů a odlišných termálních profilů



...rádi Vám představíme analyzátor InGenius, jakož i další převratné analyzátoři nukleových kyselin světových výrobců.

BIOMEDICA ČS, s.r.o.
 Sokolovská 100/94 • 186 00 Praha 8 – Karlín • T +420 283 933 605 • F +420 283 932 507
 info@bmgpr.cz • www.bmgpr.cz



HIGH PLEX 384 SYSTEM™

UZAVŘENÝ AUTOMATIZOVANÝ SYSTÉM VČETNĚ SOFTWARE. MOŽNOST BEZPLATNĚ INSTALACE.

ŠIROKÝ VÝBĚR PANELŮ:

RESPIRAČNÍ, GASTROINTESTINÁLNÍ, STI, MENINGITIDY, ENCEFALITIDY, SEPSE, PARAZITÁRNÍ INFEKCE, BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE, HPV, INFEKČNÍ KONTROLA

Výrobce: AusDiagnostics > **Země původu:** Austrálie

- > Automatizovaný systém k provádění vysoce multiplexních reakcí pro detekci patogenů z různých klinických vzorků patentovanou technologií **Multiplex Tandem PCR (MT-PCR)**
- > K dispozici široká škála „ready to use“ souprav
- > Analýza až 24 vzorků najednou
- > Systém je certifikován CE/IVD



NextGENe[®]

Next Generation Sequencing Software
for Biologists

Biologist Friendly Windows[®] interface:

Application driven

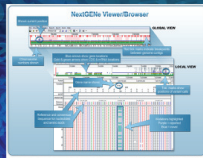
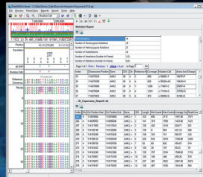
Automated inspection of input files
to set analysis parameters
Requires no scripting,
Reduces bioinformatics requirements

Application Modules for:

SNP/Indel/Structural Variant Analysis
CNV Analysis, Somatic Mutation Mining
Large Genome Alignment and Variant Discovery
Exome Analysis and Variant Discovery
RNA-Seq/Transcriptome Analysis
Targeted Sequencing and Resequencing Analysis
HLA Analysis, STR Human Identity Analysis
de novo & Paired End Assembly
Paired End Merging, Digital Gene Expression
Metagenomic Analysis
miRNA Discovery and Quantification
Rare Disease Analysis and Prediction
Multiple Project Comparison

Compatible with:

Ion Torrent Platforms, Roche Sequencing Platforms,
Illumina Sequencing Platforms, Life Technologies SOLiD[™] Systém



CarolinaBiosystems

Produkty a služby pro molekulární biologii

Nabízíme kvalitní přístroje, chemii,
software a certifikovaný servis DNA
sekvencí za rozumné ceny

- kompletní servis DNA sekvencí
certifikovanými technikami
- spotřební materiál pro DNA
sekvencování
- analytický software pro Sangerovo i
NGS sekvencování
- pipety
- elektroforézy
- PCR thermocyklery
- izolační RNA, DNA kity

Carolina Biosystems, s.r.o.

Drnovská 1112/60

161 00 Praha 6

www.carolinabiosystems.com

SOFTGENETICS[®]
Software PowerTools for Genetic Analysis

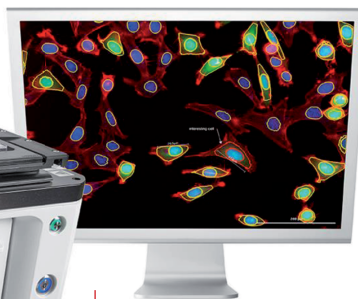
DIALAB

LIONHEART FX[™]

Přístrojové vybavení

Biochemické, imunologické a hematologické analyzátoři

Standardní i multidetekční readers, promývačky, dispensory



Think Possible

BioTek[®]

Dialab spol. s r.o.

Nám. Osvoboditelů 1

153 00 Praha 5 – Radotín

tel./fax.: 257 910255, 260, 263

e-mail: office@dialab.cz

Automatické snímání obrazu buněk, včetně záznamu videa
a možností anotací

Čtyři módy zobrazení – brightfield – průzračný, barevný,
fázový kontrast a fluorescenční

Automatická nastavitelná analýza snímaného obrazu
(počty částic, velikosti apod.) pomocí SW GEN 5

Kompaktní rozměry



 **DiaSorin**
Molecular

NOVÉ
řešení pro rychlou
molekulární **diagnostiku**

LIAISON® MDX

One instrument. Multiple discs.



The Diagnostic Specialist

Maxwell® RSC Instrument

Automatická purifikace nukleových
kyselin s vestavěnou kvantifikací


EASTPORT
LIFESCIENCE

Meet
Maxwell



 EASTPORT
LIFESCIENCE

EAST PORT Praha, Možného 10, 161 00 Praha 6, www.eastport.cz
t: 235 318 177, 800 100 529, f: +420 233 312 428, e: eastport@eastport.cz








Kit components	Quantity	Labelling
HCV LC Mix	5 x 200 µl	S-36/37
Enzyme Mix	1 x 35 µl	S-36/37
K. RNA 01	5 x 100 µl	S-36/37
001 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
002 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
003 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
004 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
005 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
006 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
007 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
008 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
009 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
010 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
011 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
012 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
013 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
014 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
015 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
016 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
017 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
018 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
019 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
020 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
021 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
022 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
023 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
024 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
025 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
026 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
027 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
028 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
029 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
030 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
031 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
032 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
033 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
034 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
035 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
036 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
037 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
038 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
039 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
040 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
041 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
042 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
043 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
044 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
045 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
046 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
047 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
048 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
049 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37
050 (1 x 10 ⁶ IU/µl)	2 x 100 µl	S-36/37

Soupravy EliGene® pro DNA diagnostiku | Soupravy pro izolaci DNA / RNA | Polymerázy, mastermixy a enzymy EliZyme™ | ZEPHYRUS® PCR Box
 Soupravy značek MO BIO a Perkin Elmer pro izolaci DNA / RNA | Syntéza oligonukleotidů a sond | Sekvenování DNA | Spotřební materiál pro laboratoře (rukavice, plast aj.)

Více na: www.elisabeth.cz | www.eligene.com | www.elizyme.com

Real-time PCR soupravy s citem pro každý detail

IVD soupravy pro:

-  trombofilní mutace
-  farmakogenetiku
-  genetiku
-  onkologii
-  detekci a kvantifikaci patogenů

NOVÉ

- gb GENETIC APOE
- gb PHARM CYP2C19
- gb PHARM UGT1A1



HPST, s.r.o.
Na Jetelce 69/2
190 00 Praha 9
Česká republika

Tel.: +420 244 001 231
Fax: +420 244 001 235
E-mail: info@hpst.cz
Web: www.hpst.cz

Autorizovaný
distributor
Agilent
Technologies



Agilent Technologies

Autorizovaný distributor

Agilent 4200 TapeStation

Rychlá a spolehlivá kontrola kvality a kvantity vzorků nukleových kyselin pro NGS a další aplikace.

- automatické nanášení vzorků
- aplikace v plném rozsahu velikostí DNA a RNA
- flexibilní počet vzorků v analýze (1 až 96)
- spotřeba vzorku pouze 1 – 2 μ l
- „ready-to-use“ spotřební materiál (ScreenTape)
- rychlé a spolehlivé výsledky
- vysoká citlivost, nulové riziko kontaminace



Chcete vědět více? Navštivte naše webové stránky www.hpst.cz nebo kontaktujte našeho produktového specialistu!

Aleš Merta | e-mail: amerta@hpst.cz | gsm: 731 538 641



Izolace čisté DNA/RNA

Krev, tělní tekutiny, tkáně, viry, bakterie, rostliny, FFPE bez Xylenu

Od 35 minut

16 pozic

Připravené kartridže

Magnetické částice

Automat

CE IVD

Až z 2400 μ l

UV lampa

Termotiskárna

Dotykový displej

USB rozhraní

Od 390 000 Kč



Vestavěný automatický spektrofotometr

Vyzkoušejte zdarma přímo ve Vaší laboratoři

Michal Sklenář | +420 739 654 976 | michal.s@krd.cz

MyGo Mini

KOMPAKTNÍ qPCR TERMOCYKLER BEZ POHYBLIVÝCH ČÁSTÍ



- 16 pozic
- 2 kanály
- HRM analýza
- genotypovací analýza

www.labmark.cz

labmark@labmark.cz

Společnost LABOSERV s.r.o. je již jednadvacet let spolehlivým partnerem laboratoří zabývajících se imunologickou a mikrobiologickou diagnostikou. Dodáváme kompletní soupravy pro ELISA, IFA, ImunoBlot a PCR diagnostiku. V našem sortimentu je také přístrojové vybavení pro zpracování těchto souprav, univerzální laboratorní přístroje a spotřební materiál.

Cílem naší činnosti je spokojenost našich odběratelů s kvalitou dodávaných produktů a námi poskytovaných služeb.



Výběr z nabídky Real-Time PCR

MULTIPLEX pro detekci mikrobiálního genomu

Respirační infekce:

- bakteriální – *M. pneumoniae* / *Ch. pneumoniae*
- virové – **ARVI screen** (13 patogenů: Rhinovirus (hRv) RNA; Adenovirus B, C, E (hAdv) DNA; Respiračně-syncytiální virus (hRSV) RNA; Coronavirus (hCov) RNA: OC43, E229, NL63, HKUI; Parainfluenza virus 1 – 4 (hPiv) RNA; Metapneumovirus (hMpv) RNA; Bocavirus (hBov) DNA)

Neuroinfekce:

- **TBEV** / *B. burgdorferi* / *A. phagocytophilum* / *E. chaffeensis* / *E. muris*

Sexuálně přenosné infekce:

- *Ch. trachomatis* / *Ureaplasma* / *M. genitalium* / *M. hominis*



LABOSERV s.r.o.
Tuřanka 1222/115 627 00 Brno
www.laboserv.cz www.lshop.cz
objednavky@laboserv.cz



Real-time PCR singlety i multiplexy (CE IVD) renomovaných evropských výrobců

dostupné i v lyofilizovaných
formátech

aplikovatelné v kombinaci
s revoluční real-time PCR
platformou MIC (BMS)



SERVIS PRO SEKVENÁTORY A REAL-TIME PCR PŘÍSTROJE APPLIED BIOSYSTEMS®

- » Diagnostika závad, opravy, kalibrace
- » Preventivní prohlídky, ověření funkčnosti přístrojů
- » Dlouhodobé servisní kontrakty
- » Technická a aplikační podpora
- » Originální náhradní díly
- » Možnost předplacení servisních služeb



Applied Biosystems je registrovaná obchodní známka společnosti Life Technologies.





RUTINNÍ ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN

PROGRAM A SBORNÍK KONFERENCE RANK 2018

Vydalo STAPRO s. r. o., Pernštýnské nám. 51, 530 02 Pardubice
jako doprovodnou publikaci konference RANK 2018.

Vytiskla tiskárna Studio Press s.r.o.,
V Kapslovně 2770, 130 00 Praha 3.



Adresa pořádající organizace:

MeDiLa spol. s r.o.
Štrossova 239
530 03 Pardubice
IČ: 632 17 767

e-mail: pcr.lab@medila.cz
tel: +420 602 431 809

www.rank.cz