
Laboratoř molekulárně mikrobiologických analýz

Rok pořízení	2018 - 2020
Financování	OP VVV CORE FACILITIES CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002515
Zodpovědná osoba	prof. MUDr. Pavel Bošík, Ph.D.

8-kapilární sekvenátor ABI 3500 Genetic Analyzer

Genetický analyzátor ABI 3500 se řadí mezi přístroje pro analýzu fluorescenčně značené DNA s využitím technologie kapilární elektroforézy s osmi kapilárami založené na Sangerově metodě.

Sangerova metoda využívá principu PCR s fluorescenčně značenými dideoxynukleotidy. Produkty jsou analyzovány kapilární elektroforézou a hodnoceny v tzv. sekvenogramu. V kapilárovém provedení je Sangerova metoda v současné době stále nejpoužívanější a nejspolehlivější metodou. Při kapilárním sekvenování jsou sekvenovány jednotlivé fragmenty DNA, připravené PCR amplifikací, s tím, že na výše uvedeném sekvenátoru je možnost paralelní sekvence až 8 sekvencí. Délka získaných sekvencí je přibližně 700 bp, chybovost je cca 1,5% (tzn. jedna báze z cca 66 bází je přečtena chybně). V rámci molekulární mikrobiologie lze na uvedeném přístroji detekovat prakticky jakoukoliv bakterii, jejíž genom byl již sekvenován a vložen do databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information), většinou se sekvenuje vysoce konzervativní oblast 16S rRNA genu. Vhodnější pro identifikaci sekvencí na tomto sekvenátoru jsou vzorky, kde se předpokládá přítomnost pouze jedné bakterie, případně předem připravený neznámý bakteriální kmen, nikoliv vzorky obsahující bakterií více.



NGS sekvenátor MiseQ Systém

Jedná se o přístroj s technikou tzv. masivního paralelního sekvenování (MPSS - z anglického „Massively Parallel Signature Sequencing“). Tato technika umožňuje univerzálně charakterizovat a kvantifikovat různé nukleové kyseliny, ať už mikrobů, zvířat nebo lidí. Nukleová kyselina je rozdělena na fragmenty o určité délce, z nichž každý fragment je amplifikován samostatně a mnoho takto vzniklých kopií každého fragmentu je poté čteno technologií podle použité platformy. Jednoduše řečeno, touto technikou je možno identifikovat nikoliv jeden druh nukleové kyseliny jako u

Sangerova sekvenování, ale desítky až stovky druhů. Sekvenační schéma je následující: Příprava sekvenační knihovny, sekvenování a detekce nukleotidů, softwarová analýza získaných dat.

Obzvláště výhodné je použití v mikrobiologii při analýze tzv. mikrobiomů, což je výraz pro společenství mikrobů, zejména bakterií nebo kvasinek, které jsou přítomny běžně v různých ústrojích člověka. Může se jednat o střevní, vaginální nebo kožní a další mikrobiom. Velkou výhodou je že NGS sekvenování umožní detekovat takřka veškeré bakterie, které jsou například přítomné ve stolici a to i takové, které není možné pěstovat na umělých půdách, tzv. živných médiích nebo agarrech, čili není možné je prokázat kultivačně. Poměrně dobře je známo, že ve střevním mikrobiomu člověka se nachází až několik stovek druhů bakterií a kultivačně lze prokázat často pouze několik jednotek, maximálně desítek z nich. Právě porovnání zmíněného střevního mikrobiomu například od pacientů se zánětlivými střevními chorobami s mikrobiomem střeva zdravých lidí může být nápomocné ve vývoji léčby pro nemocné jedince. Opakovaně se zjistilo, že u různých chorob včetně zánětlivých onemocnění střeva se vyskytuje podobná skupina bakterií, která zhoršuje průběh nemoci anebo naopak určitá skupina bakterií pro lepší průběh nemoci chybí. V takovém případě pak lze buď nežádoucí skupinu bakterií potlačit specifickými léčivy anebo naopak dodat žádoucí skupinu bakterií ve formě probiotik.

Přístroj vzhledem k výše uvedenému generuje enormní množství dat, pro jejichž zpracování disponuje výkonnou výpočetní stanicí s úložištěm.

GeneXpert IV - 4L automatizovaný detekční systém

Zařízení GeneXpert je uzavřený a plně automatizovaný systém, který je v rychlém čase schopen ze vzorku přidaného do speciální kazety (cartridge) provést izolaci nukleové kyseliny, vlastní polymerázovou řetězovou reakci s detekcí produktu a následné vyhodnocení. Zjednodušeně řečeno se jedná zařízení, které v sobě kombinuje automatický izolátor, manuální přípravu reakční směsi pro polymerázovou řetězovou reakci, real-time PCR cyklér včetně vyhodnocení ve velmi kompaktních rozměrech.

Rotor-Gene Q5plex HRM (real-time PCR cyklér)

Přístroj "rotorgene" je schopen na základě polymerázové řetězové reakce v reálném čase (rt-PCR) s fluorescenční detekcí detekovat a analyzovat různé původce infekcí. Ať už se jedná o viry, bakterie, kvasinky a plísňe nebo různé druhy parazitů. Ve srovnání s jinými metodami poskytuje rt-PCR výsledek většinou rychleji, další výhodou je vysoká citlivost a specifita uvedené metody. Proč je vlastně tak důležité a výhodné detekovat původce infekce včas a správně? Důvodů je více: v případě, že není správně nebo vůbec zachycen původce infekce, nelze nastavit cílenou léčbu. Příkladem může být pacient se zánětem mozkových blan (meningitida) vyvolaný například bakterií *Listeria monocytogenes*. Pokud není tato bakterie u pacienta s meningitidou identifikována a pokud se o ní neuvažuje, pacient bude pro meningitidu léčen antibiotikem se širokým spektrem účinku (tzv. cefalosporinem 3. generace), který na *Listeria monocytogenes* však neúčinkuje. Důsledkem této nevléčené infekce pak mohou být další infekční komplikace vedoucí až k úmrtí pacienta. Dalším důvodem proč je nutné přesně stanovit původce infekce je riziko zvyšování rezistence k antimikrobiálním léčivům, pokud jsou používána příliš často a ne cíleně. Další výhodou této instrumentace je možnost zjistit relativně přesné množství – kvantitu například cytomegaloviru v krvi tak aby, v případě zvýšené kvantity mohla být nasazena adekvátní protivirová léčba. Uvedené je opět důležité zejména pro pacienty s hematologickými malignitami, kteří jsou k infekcím mnohem náchylnější než zdravá populace. Výše uvedené informace představují pouze zlomek možností, pro které lze přístroj využít.



Více-jednotkový systém PCR cyklerů s gradientem (podobné i pro termocyklér s gradientem)

Cyklér pro PCR (polymerázovou řetězovou reakci) je obecně řečeno přístroj, který umožňuje za použití primerů, vhodného prostředí a DNA polymerázy namnožit specifické úseky DNA. V cyklérech je možné velmi přesně nastavit teplotu mezi 4-100°C a zároveň vzorek rychle zchlazovat nebo zahřívát (řádově v sekundách). Více-jednotkový systém PCR cyklerů s gradientem je unikátní množstvím vzorků (až 384), které je možné amplifikovat ve stejnou chvíli. Zároveň je v případě potřeby možné použít každou jednotku samostatně - na každé jednotce je možné nastavit jiný teplotní profil pro PCR reakci. Výstupem amplifikace v uvedeném zařízení je buď detekce produktu v agarózovém gelu nebo případná sekvenace amplifikovaného úseku například pro typizaci viru nebo bakterie.



SaMag-12 automatický izolátor nukleových kyselin

Izolátor se řadí mezi přístroje, schopné izolovat nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) automatizovaně, tzn. bez nutnosti pipetování různých lyzovacích a promývacích roztoků, jako je tomu u manuální izolace. Izolace nukleových kyselin na uvedeném přístroji je založena na technologii magnetických částic, kdy dochází nejprve k uvolnění nukleové kyseliny a její vazbě na povrch magnetických částic. Nukleové kyseliny navázané na magnetických částicích je pak možné v několika krocích promýt a zbavit je tak různých balastních látek včetně inhibitorů PCR reakce. Poté je vyčištěná nukleová kyselina uvolněna do eluční zkumavky. Nukleovou kyselinu vyizolovanou tímto způsobem je možné skladovat v hluboko mrazicím boxu několik let. Obrovskou výhodou automatizované izolace je prakticky nulová šance cross-kontaminace vzorků, ke které může dojít při manuální izolaci nukleových kyselin. Lze izolovat nukleové kyseliny virů, bakterií, kvasinek i hub z různých typů vzorků. Ve stejném čase je rovněž možno izolovat nukleovou kyselinu z 1 nebo až 12 vzorků.

Autor textu: Mgr. Rudolf Kukla, Ph.D.