

Využití metodiky PCR k detekci infekce *Helicobacter* spp.

Michal Kolorz², Roman Husník¹, Kateřina Wróbllová²,
Ladislava Bartošová², Lucia Frgelecová³,
Petr Fictum³, Jiří Klimeš⁴, Kateřina Pavlicová⁵

¹Klinika chorob psů a koček (**FVL**), ² Ústav humánní farmakologie a toxikologie (**FaF**),

³ Ústav patologické morfologie (**FVL**), ⁴ Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat (**FVHE**), ⁵ Studentka 6.ročníku (**FVHE**), **VFU Brno**

Možnosti detekce Helicobacteria

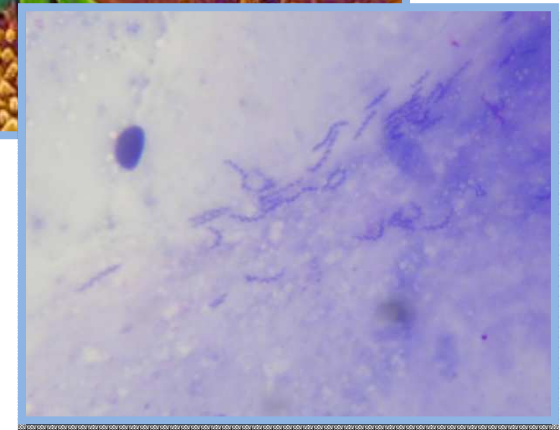
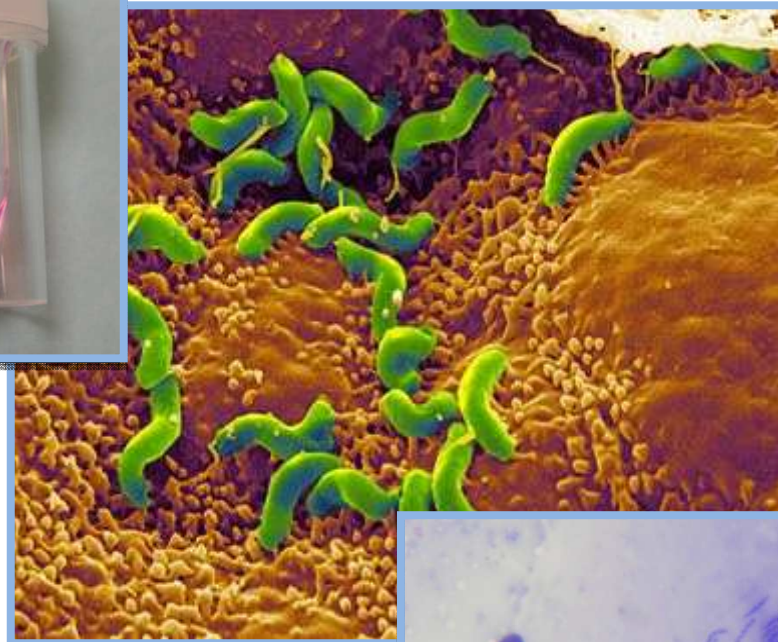
Ureázový test

Cytologie

Kultivace

Stříbření

PCR



PCR

Amplifikace sekvencí DNA specifických pro *Helicobacter spp.*

Rozlišení jednotlivých kmenů *Helicobacter spp.* na základě detekce specifických sekvencí

DNA

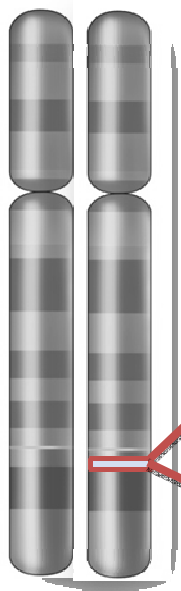
Potřeba malého množství biologického materiálu, reprodukovatelnost testu

Cíle

1. Vytvořit metodiku PCR umožňující stanovení přítomnosti *Helicobacter* spp. v biopsii
2. Porovnat metodiku PCR s jinými metodami detekce patogena
3. Vytvořit metodiku PCR umožňující stanovit konkrétní kmen *Helicobacter* ve vzorku

Princip detekce

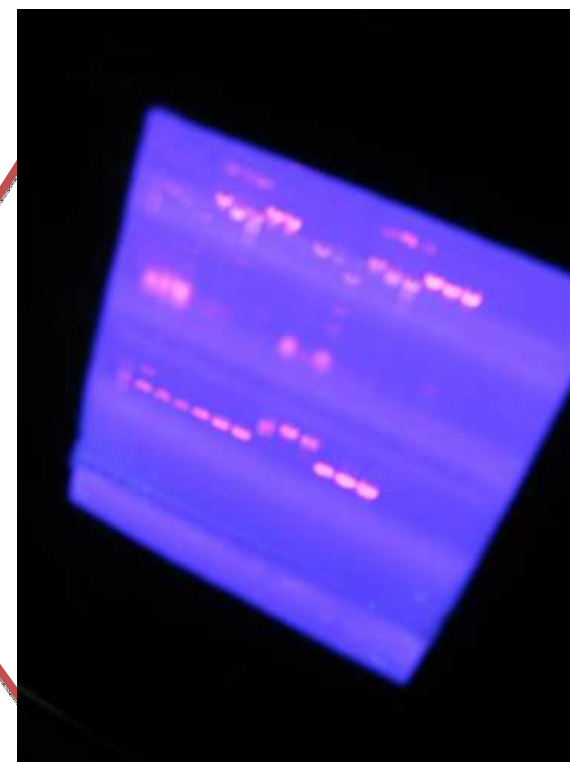
Izolace DNA z
biopsátu



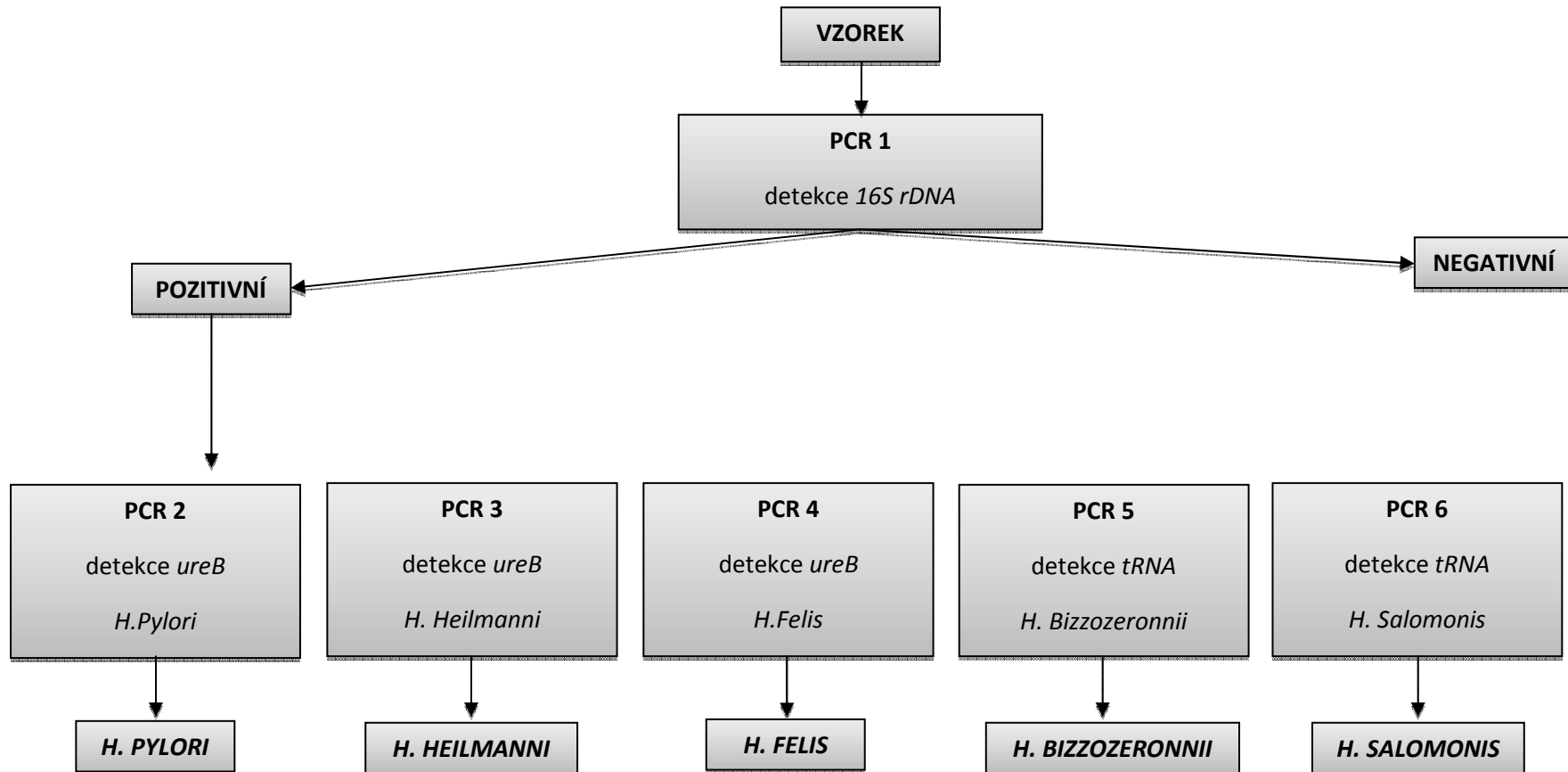
PCR
amplifikace



Elektroforéza NK



Postup při určení jednotlivých kmenů



Postup při určení jednotlivých kmenů

PCR 1

detekce sekvence DNA (gen kódující ribosomální protein) přítomné u všech kmenů *Helicobacter spp.*

PCR 2-6

detekce sekvence DNA popsané pouze u konkrétních kmenů geny kódující ureasu, tRNA

Testovaný soubor

Vzorky:
psí pacienti Kliniky
chorob psů a koček,
FVL, VFU Brno

počet biopsií	53
ureázový test	53
cytologie	51
histologie	48
PCR	53

VÝSLEDKY

číslo vzorku	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5	HP6	HP7	HP8	HP9	HP10
ureázový test	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
cytologie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
histologie	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

číslo vzorku	HP11	HP12	HP13	HP14	HP15	HP16	HP17	HP18	HP19	HP20
ureázový test	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
cytologie	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
histologie	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

číslo vzorku	HP21	HP22	HP23	HP24	HP25	HP26	HP27	HP28	HP29	HP30
ureázový test	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
cytologie	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
histologie	+	+	-	X	-	-	+	+	+	-
PCR	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-

číslo vzorku	HP31	HP32	HP33	HP34	HP35	HP36	HP37	HP38	HP39	HP40
ureázový test	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
cytologie	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
histologie	-	-	+	+	-	X	+	X	-	-
PCR	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+

číslo vzorku	HP41	HP42	HP43	HP44	HP45	HP46	HP47	HP48	HP49	HP50
ureázový test	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
cytologie	+	-	-	+	+	+	+	X	+	-
histologie	-	-	-	+	+	+	X	X	+	-
PCR	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-

číslo vzorku	HP51	HP52	HP53
ureázový test	+	+	+
cytologie	+	+	X
histologie	+	+	+
PCR	+	+	+

VÝSLEDKY

číslo vzorku	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5	HP6	HP7	HP8	HP9	HP10
ureázový test	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
cytologie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
histologie	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

číslo vzorku	HP11	HP12	HP13	HP14	HP15	HP16	HP17	HP18	HP19	HP20
ureázový test	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
cytologie	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
histologie	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

číslo vzorku	HP21	HP22	HP23	HP24	HP25	HP26	HP27	HP28	HP29	HP30
ureázový test	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
cytologie	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
histologie	+	+	-	X	-	-	+	+	+	-
PCR	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-

číslo vzorku	HP31	HP32	HP33	HP34	HP35	HP36	HP37	HP38	HP39	HP40
ureázový test	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
cytologie	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
histologie	-	-	+	+	-	X	+	X	-	-
PCR	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+

číslo vzorku	HP41	HP42	HP43	HP44	HP45	HP46	HP47	HP48	HP49	HP50
ureázový test	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
cytologie	+	-	-	+	+	+	+	X	+	-
histologie	-	-	-	+	+	+	X	X	+	-
PCR	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-

číslo vzorku	HP51	HP52	HP53
ureázový test	+	+	+
cytologie	+	+	X
histologie	+	+	+
PCR	+	+	+

VÝSLEDKY

číslo vzorku	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5	HP6	HP7	HP8	HP9	HP10
ureázový test	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
cytologie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
histologie	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

číslo vzorku	HP11	HP12	HP13	HP14	HP15	HP16	HP17	HP18	HP19	HP20
ureázový test	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
cytologie	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
histologie	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

číslo vzorku	HP21	HP22	HP23	HP24	HP25	HP26	HP27	HP28	HP29	HP30
ureázový test	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
cytologie	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
histologie	+	+	-	X	-	-	+	+	+	-
PCR	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-

číslo vzorku	HP31	HP32	HP33	HP34	HP35	HP36	HP37	HP38	HP39	HP40
ureázový test	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
cytologie	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
histologie	-	-	+	+	-	X	+	X	-	-
PCR	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+

číslo vzorku	HP41	HP42	HP43	HP44	HP45	HP46	HP47	HP48	HP49	HP50
ureázový test	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
cytologie	+	-	-	+	+	+	+	X	+	-
histologie	-	-	-	+	+	+	X	X	+	-
PCR	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-

číslo vzorku	HP51	HP52	HP53
ureázový test	+	+	+
cytologie	+	+	X
histologie	+	+	+
PCR	+	+	+

ZÁVĚR

Optimalizovali jsme metodu detekce *Helicobacter spp.* založenou na PCR

Výsledky jsme porovnali s jinými metodami průkazu patogena

Probíhá validace metodik umožňujících určení konkrétního kmene *Helicobacteria*

DĚKUJI ZA POZORNOST



Tento projekt je finančně podporován grantovou agenturou IGA VFU (IGA VFU 31/2010/FVL)