



9.-13.1.2023



2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA
UNIVERZITA KARLOVA



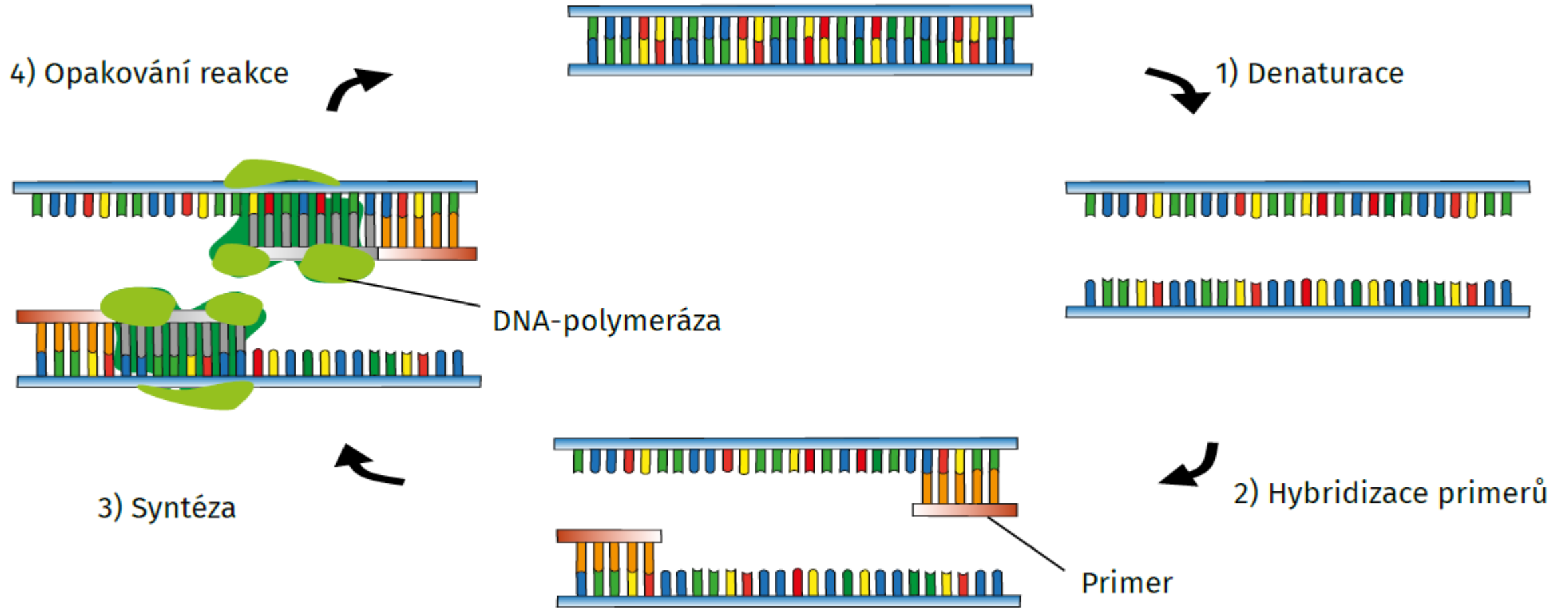
UNIVERZITA
KARLOVA

VP Klinická mikrobiologie PCR

Jakub Hurych

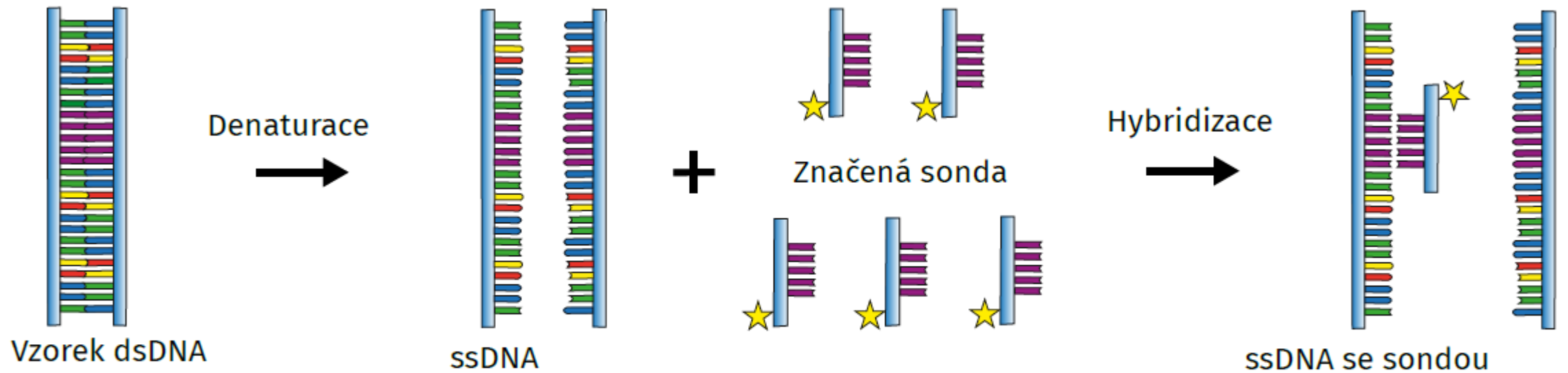
Ústav lékařské mikrobiologie 2.LF UK a FN Motol

Basic principles



OBR. 207 ZNÁZORNĚNÍ KROKŮ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZCOVÉ REAKCE

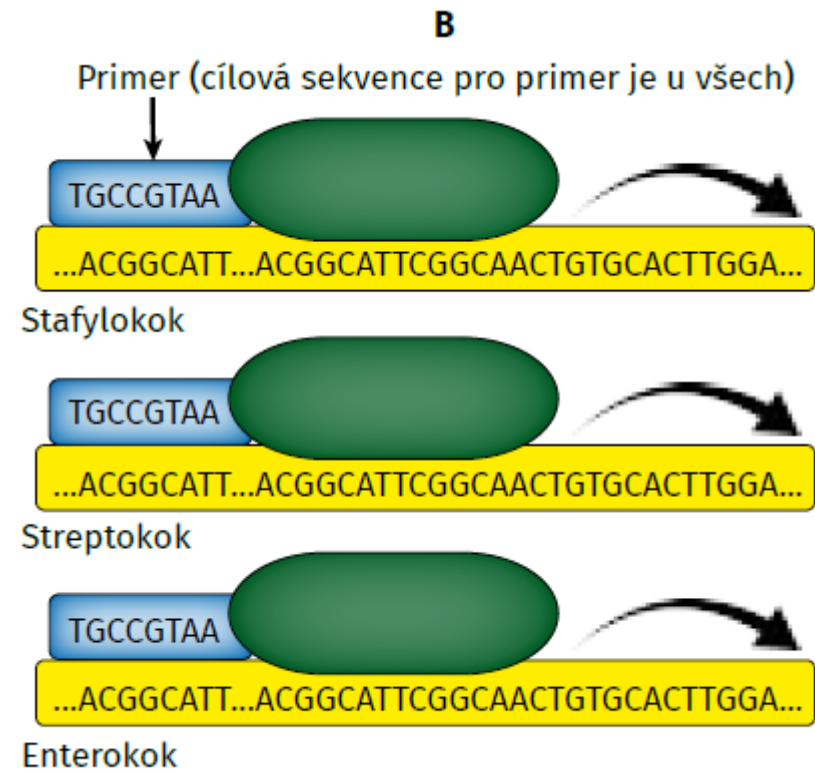
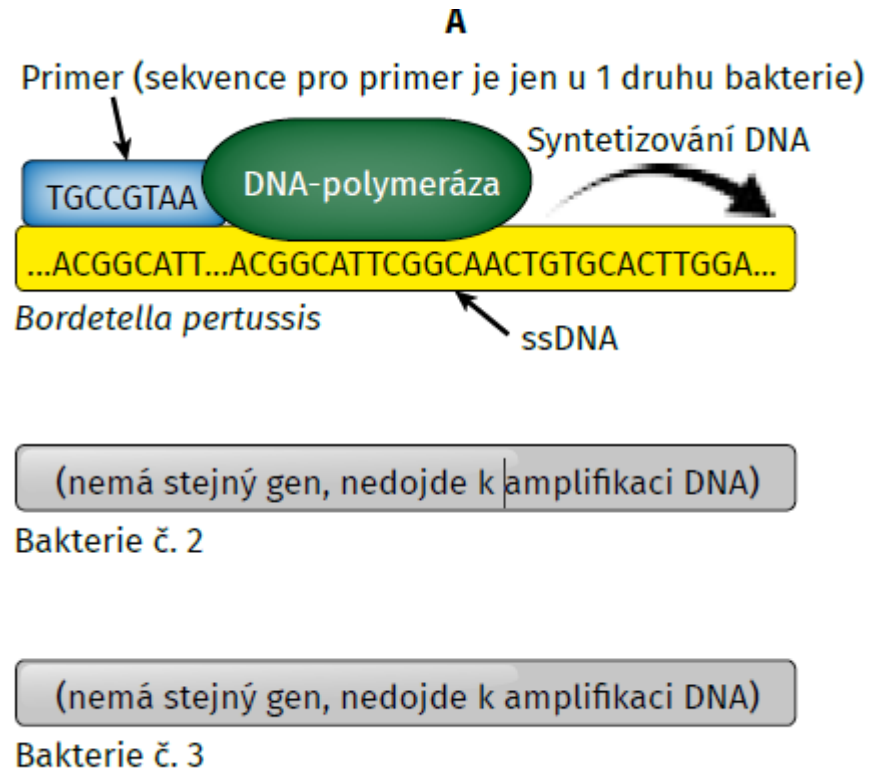
Basic principles



OBR. 206 PRINCIP FUNGOVÁNÍ GENOVÉ SONDY (DNA SONDY)

ssDNA – jednořetězcová DNA, dsDNA – dvouřetězcová DNA

Patogen-specifické PCR // panbakteriální PCR



+ multi-plex PCR

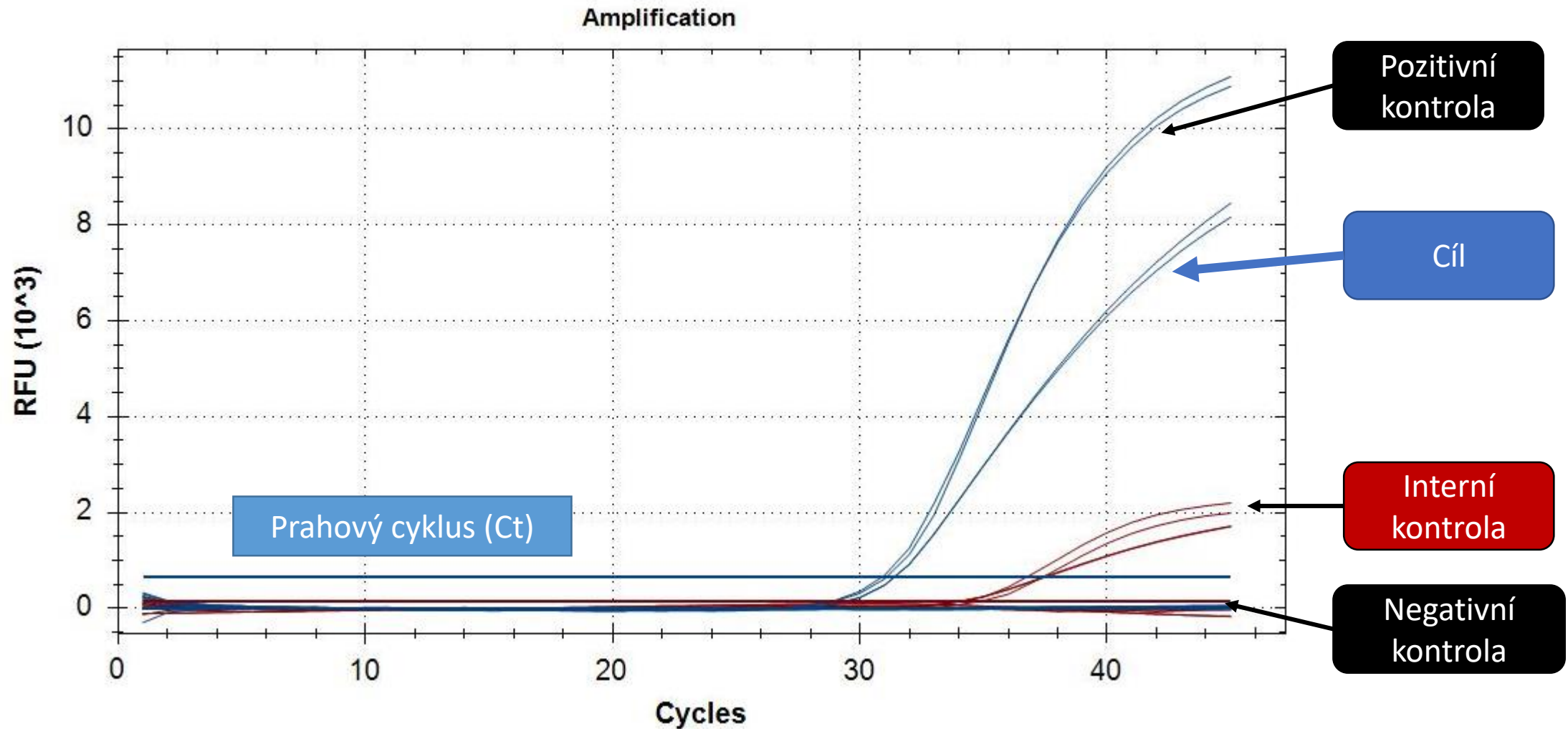
Rozlišujte:

- Typ PCR reakce (patogen spec. / panbakteriální)
- Spektrum (single-plex / multi-plex)
- Vizualizace (gelová ELFO / qPCR)
- Hodnocení (gelová ELFO / real-time PCR)

Interpretace nálezů

- Kontrolní body v analýze křivek
- Melting curve analýza
- Kvantita
- 16S rDNA PCR

Základy hodnocení PCR křivek



Základy hodnocení PCR křivek

Melting curve analysis

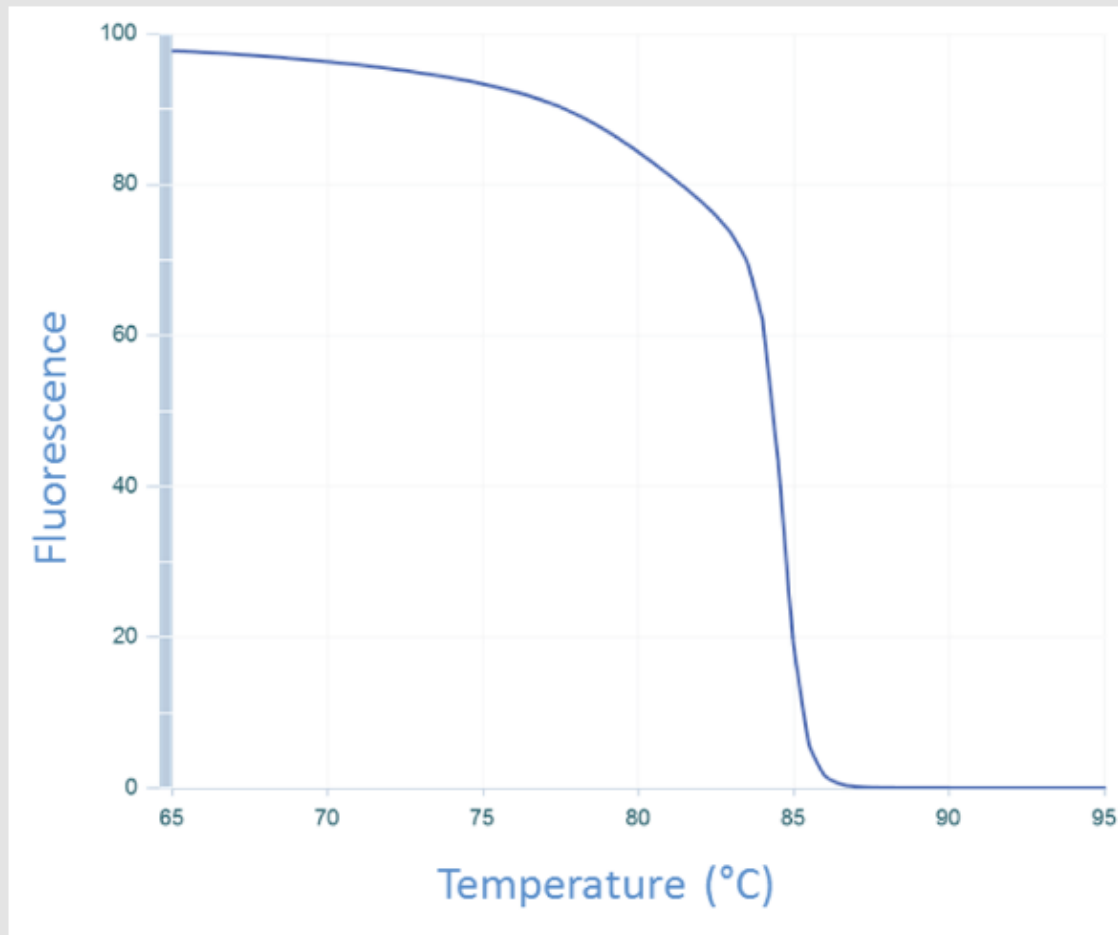


Figure 3. Dissociation curve of CFTR exon 17b amplicon. Change in fluorescence with increasing temperature is measured. As the temperature is increased, the 2 strands of the amplicon separate to form single-stranded DNA, causing the fluorescent intercalating dye to dissociate from the DNA and stop fluorescing.

Základy hodnocení PCR křivek

Melting curve analysis

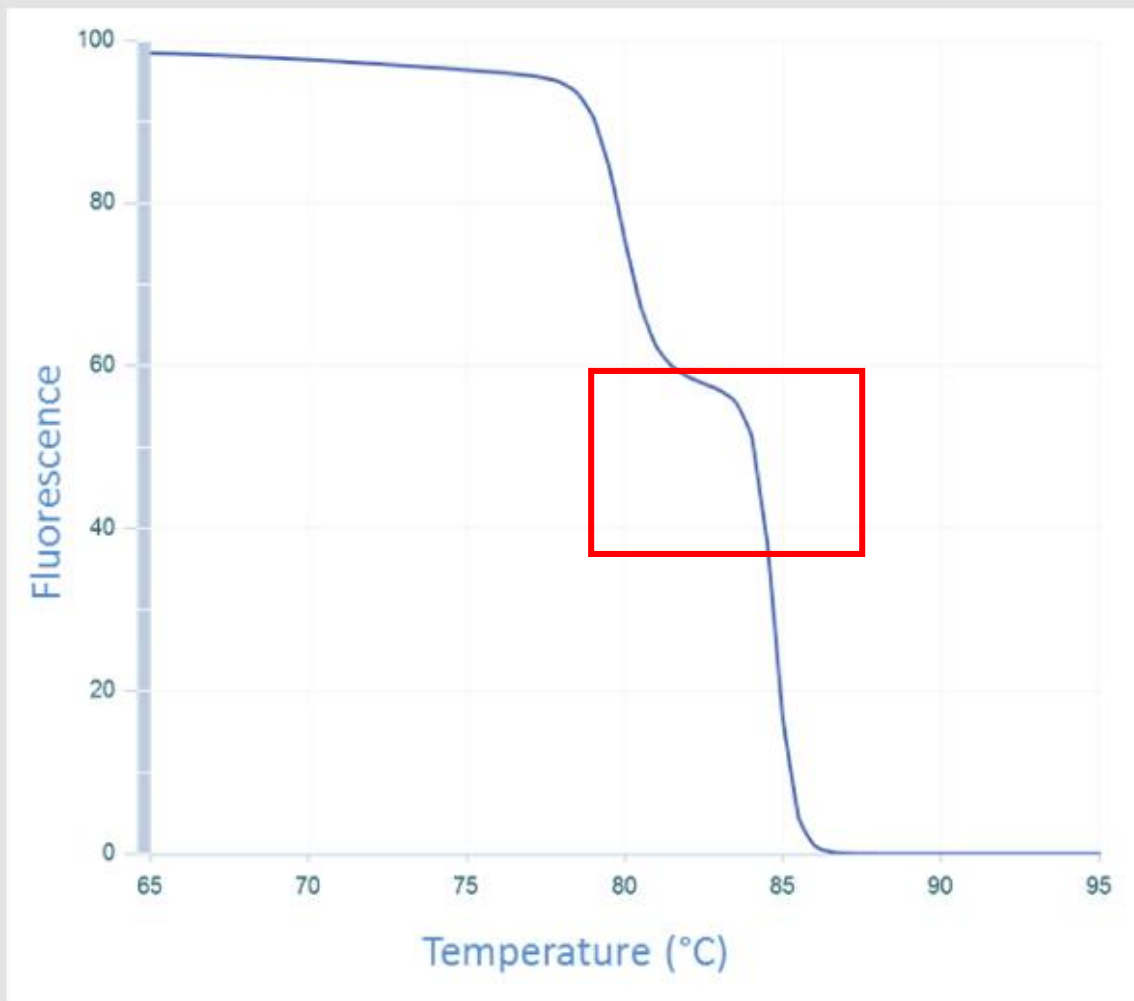
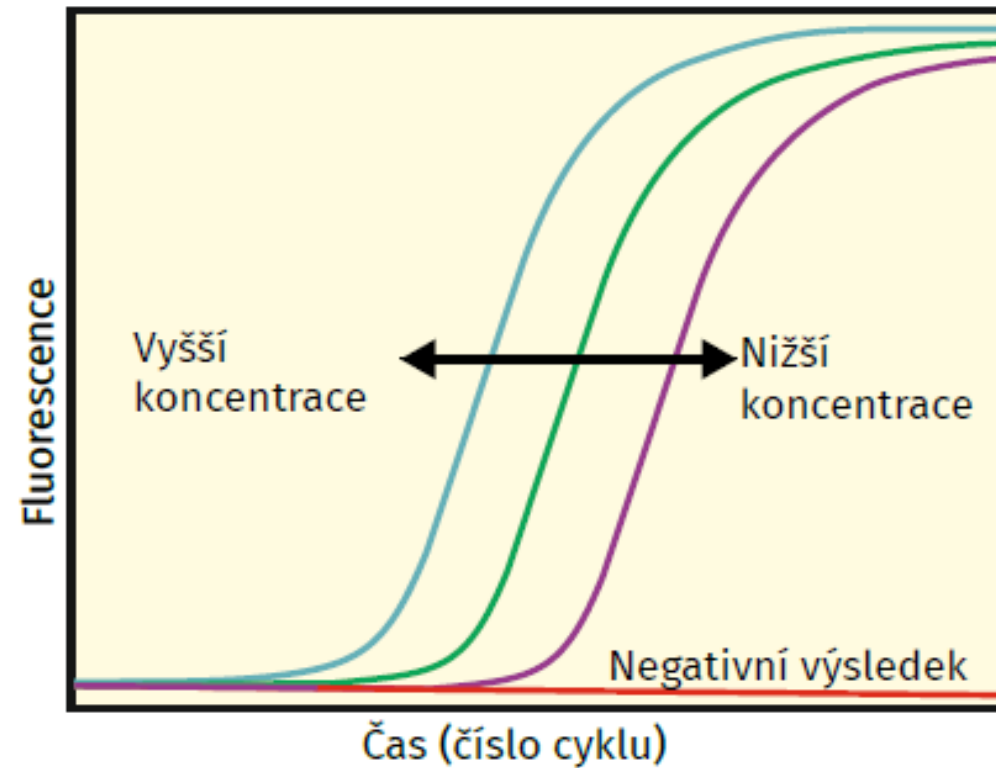


Figure 4. Dissociation curve of CFTR exon 7 amplicon. The change in fluorescence as the temperature is increased from 65°C is measured. As the temperature increases, the 2 strands of the amplicon separate to form single-stranded DNA, causing the fluorescent intercalating dye to dissociate from the DNA and stop fluorescing. The shoulder in the curve between 80°C and 85°C suggests the presence of an intermediate state where the DNA is in both double-stranded and single-stranded configurations.

Kvantita



**OBR. 208 GRAF ZNÁZORNŮJÍCÍ SÍLU SIGNÁLU
DETEKOVANÉHO PŘÍSTROJI PRO REAL-TIME PCR**

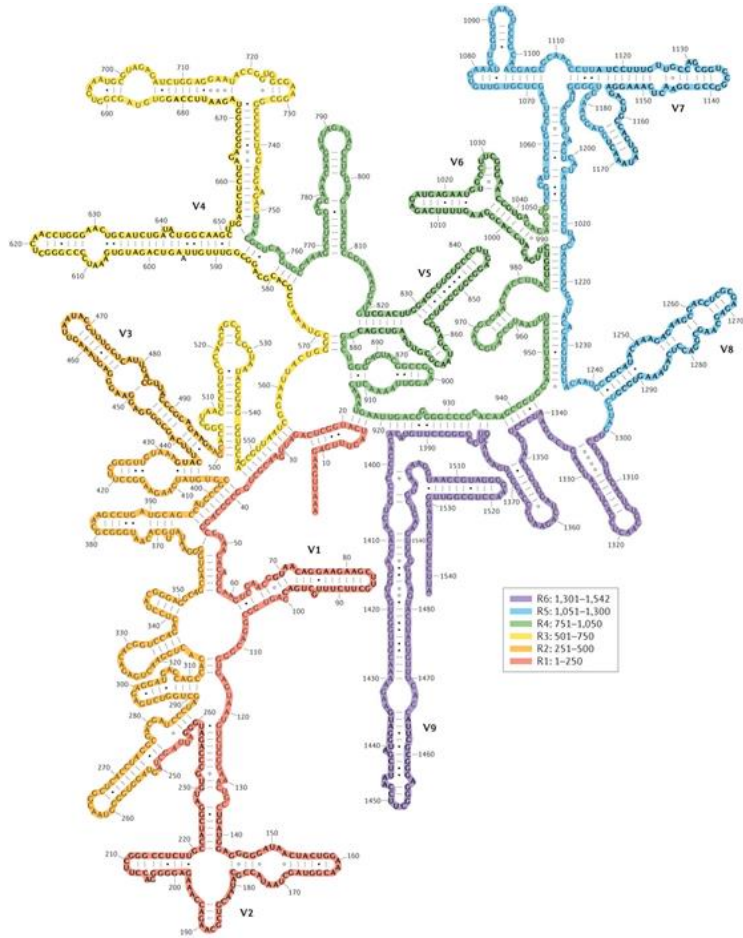
Při vyšší koncentraci nukleové kyseliny je zvýšení signálu zachyceno dříve. Plochá křivka představuje negativní výsledek.

Panbakteriální PCR

- Dvoukolový proces

Amplifikace 16S rDNA

Sekvenování ampliconu
16S rDNA



16S rDNA is a linear structure - > transcribes into a linear rRNA, and folds.



CONSERVED REGIONS: unspecific applications

VARIABLE REGIONS: group or species-specific applications

Figure 1: An example of a 16S rRNA gene. The regions in green are conserved in all microorganisms. These are the sites that are targeted by primers for PCR amplification so that all the 16S rRNA genes in a sample are amplified. The grey regions are the species-specific regions that-- when sequenced-- allow for scientists to see which species are present in a community. Image courtesy of: <http://www.alimetrics.net/en/index.php/dna-sequence-analysis>

Panbakteriální PCR

- Využití:

Primárně sterilní materiály

Srdeční chlopně

Punktáty

Likvor

Velmi vzácně i krev, BAL

Ještě vzácněji narostlé kultury

Význam molekulárních metod

Výhody

Vysoká senzitivita i specificita

Větší detekční schopnost

Rychlost

Bezpečnost (po izolaci)

Kvantifikace

Fenotypová diskriminace

Detekce během ATB léčby

Nevýhody

Falešně pozitivní výsledky

Kontaminace jinou DNA

Neviabilní struktury – nelze zjistit
citlivost k ATB

jméno: **Rekhlitskyy Anatoliy**
RČ: 600218 / 003X
DG z.: I330 Akutní a subakutní infekční endokarditid
DG o.:

číslo: LMM-22-5572 BA/9800
mater: **Srdeční chlopeň**
upř+lok:
odděl: KOS2 Kardiolog.odd-2.stanice

odebráno: 05.12.2022
přijato: 05.12.2022-10:49
uzavřeno: 07.12.2022-15:40

Kult	Dat	Operace	Výsledek ([F10] - vstup do editoru, [Ins] - tisk, [Ctrl /Ins] - kopie operace , [Alt/Ins] - kopie větve, [Shift/Ins] - vložit kopii)		T	U	O
		Izolace NK	- Uzavřel: 07.12.22-11:21 Mgr. Dratvová Barbora	Otevřít			0
	05.12-10:50	Paralelní řada LMM					
	05.12-10:50	UMD-SelectNA				<input checked="" type="checkbox"/>	
		Panbakteriální PCR 16S	- Uzavřel: 07.12.22-11:21 Mgr. Dratvová Barbora	Otevřít			0
	05.12-10:50	Panbakteriální PCR (UMD)	20,76 cyklus POZITIVNÍ		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
	05.12-10:50	UMD Interní kontrola IC	26,12 cyklus				
	05.12-10:50	Sekvence 16S (UMD)	Streptococcus gallolyticus		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
	05.12-10:50	similarita	100 %				
	05.12-10:50	délka získané sekvence	403/403 (100%)				