



První dekáda nového tisíciletí znamenala bouřlivý rozvoj molekulárně biologických technik a jejich diagnostických aplikací, zároveň však byla i obdobím určité stability v dané oblasti. Amplifikační techniky jsou ovlivněny nástupem PCR v reálném čase, pro niž konečně bylo vyvinuto příslušné instrumentarium. Tím však byl odsunut na vedlejší kolej dosavadní vrchol automatizace end-point PCR – analyzátor COBAS® Amplicor™, neboť jeho hlavní přednosti – kvantifikační testy a multiplicitní detekci přivedla technologie real-time PCR na kvalitativně vyšší úroveň. Přesto, z dlouhodobého pohledu, byl COBAS® Amplicor™ jedním z obchodně nejúspěšnějších analyzátorů vyráběných v rámci koncernu F. Hoffmann – La Roche v továrně Tegimenta AG v Rotkreuzu u Lucernu. Vyrobito se více než 15 000 kusů vyznačujících se minimální poruchovostí, z nichž část doposud slouží v laboratořích po celém světě. Technická podpora skončí teprve v roce 2020. I v naší laboroři ve VFN jeden najdeme. Dnes slouží výlučně k diagnostice mykobakterií, pro což se výborně hodí, stejně jako do laborořích provádějících genotypizaci hepatických virů.

## Polymerázová řetězová reakce v průběhu třiceti let od první publikace – 8. část

**MUDr. EMIL PAVLÍK, CSc.**

*Ústav imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze, Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva FBMI ČVUT Kladno*

Zákazníci Roche si postupně zvykají na převratnou novinku – LightCycler® a značené sondy TaqMan™. Tenkostěnné plastové amplifikační zkumavky o objemu 200 µl byly nahrazeny kapilárami z borosilikátového skla o objemu 20 µl.

Místo 50 µl vzorku stačí 5 µl. Odečítáme současně signál 4 vlnových délek: 530, 560, 630 a 705 nm (u čtyřkanalových verzí 1.0 a 1.5). Ale především se dramaticky zkrátil čas potřebný pro změnu teploty v jednotlivých cyklech, čímž se urychlil celý proces amplifikace, k němuž bylo možno přidat 5 až 10 cyklů. To zase vedlo k dalšímu zvýšení citlivosti této diagnostické techniky. Konkurence rovněž nespí. Australská firma Corbett představuje svůj karuselový RotorGene s rotorem osazeným 36 tenkostěnnými mikrozukmavkami. Dynatech, který se stal součástí holdingu Thermo, představuje v ČR komorový SmartCycler se zvláštními



▲ Obr. č. 1: Molekulárně biologická laboratoř Cytolab, spol. s r.o. Malá, ale účelně zařízená...



plochými kazetami pro průběh reakce. Ten se v USA hojně uplatnil za panické situace se zneužitím spor antraxu k bioteroristickým účelům, kdy jím byly vybaveny úřadovny federální US Mail Service, aby jejich vyškolení pracovníci mohli testovat bílý prášek trousící se z některých zásilek. IndyCycler se ve střední Evropě neobjevil, vědeckým institucím byl však nabízen Applied Biosystems ABI3000 (Perkin-Elmer).

V roce 2003 jsem přišel jako odborný zástupce pro mikrobiologii do soukromé laboratoře Cytolab, spol. s r.o., majitelů MUDr. Pocha a RNDr. Paulíka s úkolem rozvinout segment molekulárně biologických diagnostických technik. V laboratoři byly v době mého příchodu 2 cykléry Biometra, COBAS® Amplicor™, Biohazard Box tř. 2, horizontální elektroforéza BioRad a zařízení pro manuální Elisú. Laboratoř byla velmi dobře vybavena pro sérologickou a imunologickou diagnostiku, měla šikovný a kvalifikovaný personál a výbornou ekonomickou stabilitu, umožňující potřebné investice.

Problémem byl limitovaný prostor. Potřebovali jsme další místnost. Správa budovy ji v návaznosti na stávající umístění laboratoře neměla k dispozici. V mapě pronájmu však byl skládek, místnost bez oken o podlahové ploše cca 12 m<sup>2</sup>. Během jediného víkendu byl vyklizen, v průběhu týdne truhlářská firma zhotovila stoly po celém obvodu místnosti, koncem týdne jsme se rozhodli, kam přijdou police, a přípravy byly hotovy. Pro automatizaci přípravy vzorku jsme zvolili automat MagNAPure Compact, umožňující zpracování jak DNA, tak RNA s pomocí unikátních reagenčních kazet. I přes varování, že kapacita přístroje je pouze 8 vzorků za 29 minut. Tato zdanlivá nevýhoda byla eliminována postupem v rámci laboratoře, kdy přichodící vzorky byly ihned zpracovány a teprve zpracované zmrazovány ke skladování. Tím byla maximálně využita kapacita přístroje. Na druhé straně nutno přiznat,



▲ Obr. č. 2: Pracoviště LightCycler 2.0 v laboratoři Cytolab, spol. s r.o.

že toto vytížení se projevilo v životnosti: po třech letech provozu byla poruchovost taková, že si vyžádala výměnu prakticky všech hlavních komponent stroje.

Další akvizicí byl první šestikanálový LightCycler® verze 2.0 dodaný do České republiky. Pocházel ještě z prototypové série, všechny kanály byly plně otevřené i pro vědecké účely. Tím začal náš podíl na projektech PCR Tailoring, o nichž bude řeč dále. Pro rutinní PCR jsme pořídili COBAS® TaqMan® 48 a Corbett Rotorgene 5000. S laminární skříní třídy bezpečnosti 1 jsme na 12 čtverečních metrech měli vše potřebné. Vzhledem k tomu, že laboratoř byla ekonomicky úspěšná, neměli jsme problém s jejím dovybavováním. Jediným investičním problémem byl hlubokomrazicí box (-80° C), avšak i ten jsme nakonec získali, byť již pod jiným vlastníkem. Ale o tom později.

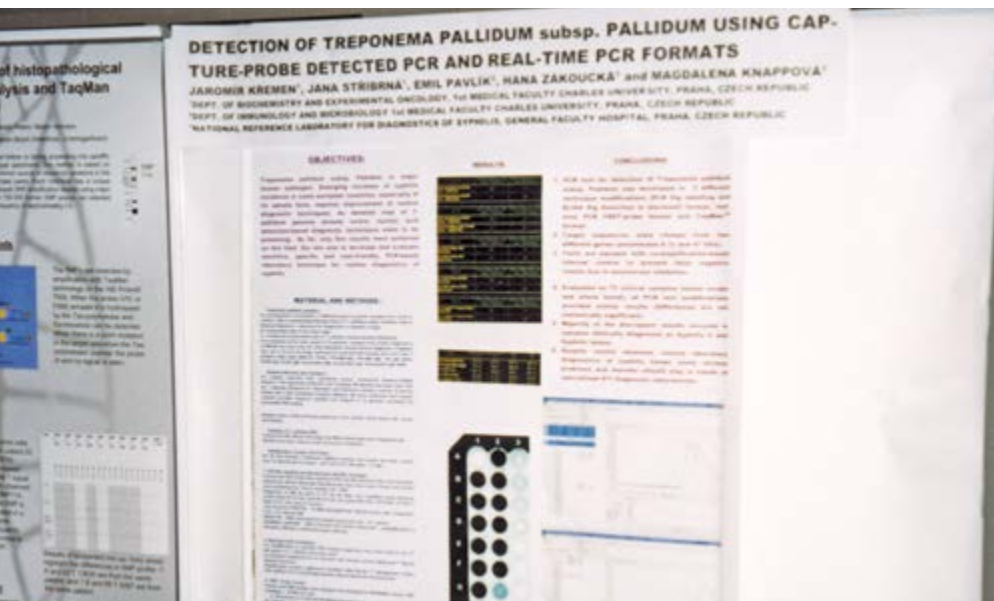
### Projekt PCR Tailoring

Projekt PCR Tailoring vznikl v posledních letech minulého tisíciletí jako služba zákazníkům, kteří si stěžovali na úzké spektrum dodavatelského portfolia PCR testů. Na mikrodestičkové platformě Boehringer Mannheim AG PCR Dig-Labeling Kit

a Dig-Detection Kit se streptavidinovou záchytnou sondou bylo možné detekovat PCR produkty s biotinylovaným 3' koncem. Amplifikace probíhala s užitím značených nukleotidů. Zákazník si doplnil primery a sondy dle vlastního návrhu. Ty bylo třeba syntetizovat. V této oblasti nabízely služby různé biotechnologické společnosti z řady zemí světa, v různé kvalitě a v různých cenách. Bohužel, ne vždy vysoká cena odrážela odpovídající kvalitu. Zde Roche Diagnostics zvolil pro spolupráci firmu TIB MolBiol Berlin. Když pak uvedla firma na trh soupravy RealTime PCR HybProbe Labelling and Detection Kit a RealTime PCR TaqMan Labelling and Detection Kit, byl zde k dispozici osvědčený partner pro zakázkovou syntézu oligonukleotidů ve vysoké kvalitě, s vhodným poměrem nukleotidů a zárukou respektování duševního vlastnictví autorů.

### Projekt Disease Management

K diagnostice virových hepatitid měla společnost Roche velmi rozsáhlé portfolio testů. A především – sesterská divize Roche Pharma produkovala Roferon A a později Pegasys. A tak se zrodil nápad, proč vzájemně nepodpořit



▲ Obr. č. 3: Prezentace výsledků práce na vývoji testu pro PCR detekci *Treponema pallidum* s využitím primerů a sond připravených MB MolBioL, Berlín

marketing. V oblasti marketingu jde většinou o tvrdý business. Zde je však třeba říci, že profitujícím z tohoto projektu je jednoznačně pacient, jemuž se dostane všeho, co mu náleží. Jak takový projekt vypadá v praxi, si ukážeme na příkladu České republiky a hepatitidy C. Podmínkou zdravotních pojišťoven pro úhradu interferonové terapie hepatitidy C byl pozitivní výsledek kvalitativního PCR testu. Dle doporučení hepatologické společnosti následoval tento postup: V den zahájení terapie byl před aplikací interferonu odebrán vzorek krve pro úvodní kvantitativní PCR vyšetření. Z něj byla zjištěna počáteční hodnota virové nálože, která měla i určitý prognostický význam. Po 3 až 4 týdnech se provedl odběr dalšího vzorku, jehož vyšetření bylo rozhodující pro další průběh léčby. Pokud došlo k poklesu hodnoty alespoň o řád, pacient na léčbu odpovídal a nebylo třeba ji upravovat. Pokud byly obě hodnoty v rozmezí stejného řádu, pacient na léčbu omezeně reagoval, situaci však bylo třeba řešit úpravou dávek. Pokud došlo k vzestupu minimálně o jeden řád, pacient na léčbu nereagoval, léčbu bylo nutno změnit. V případě změny léčby nebo dávkování se kontrolní odběr prováděl opět za 3 až 4 týdny, v ostatních případech pak každé

3 měsíce až do vymizení virémie, po dalších 3 měsících bylo třeba provést alespoň kvalitativní PCR k vyloučení relapsu po ukončení terapie. Jelikož léčba hepatitidy C trvala obvykle rok, náklady na vyšetření nebyly bezvýznamné a některé laboratoře měly problémy s nasmlouváním vyšetření u pojišťoven.

Projekt Disease Management spočíval v nabídce, že pacientům léčeným Rofeironem nebo Pegasysem uhradí dodavatel léku náklady na laboratorní monitoring léčby. Projekt měl globální platnost, v České republice se k akci připojila i konkurenční společnost Shering-Plough, která nakoupila vyšetřovací soupravy COBAS® AmpliCor™ HCV Monitor pro pacienty léčené preparáty Intron a Pegintron.

### Moje účast na projektu v Turkmenistánu

Turkmenistán je postsovětská republika ležící v Asii. Její území zahrnující 488 000 km<sup>2</sup> začíná na březích Kaspického moře a podél hranice s Íránem se táhne k podhůří Hindúkuše, kde hraničí s Afghánistánem. Severními sousedy jsou Uzbekistán, s nímž část hranice tvoří řeka

Amudarja, a v oblasti Kaspiku pak Kazachstán. 80% převážně nížinatého území zaujímá písečná poušť Karakum. Hlavní město Ašchabad leží v horách 30 km od íránské hranice. Jeho mezinárodní letiště je využíváno při cestách do Afghánistánu k natankování pohonných hmot jak civilními, tak vojenskými letadly. Turkmenistán vystoupil ze svazku SSSR jako poslední svazová republika, a přestože zůstal formálně členem Společenství nezávislých států, je jedinou postsovětskou republikou s vízovou povinností při cestách do Ruské federace. Země rovněž čelila tvrdým energetickým sankcím iniciovaným Ruskem. Přestože má Turkmenistán velké zásoby ropy i zemního plynu, tyto suroviny zde – s ohledem na polohu země ve složitých geologických podmínkách – nebyly těženy a země byla zásobována podmořským ropovodem a plynovodem z ázerského Baku. Uprostřed zimy 1992/1993 došlo k náhlému uzavření kohoutů. A země mrzla. V čele země stál bývalý první tajemník KST Saparmurat Ataevič Nijazov

### Ázerský nebo Ázerbajdžánský?

Většinový národ (91 %), který obývá stát Ázerbajdžán, jsou Ázerové, nejbližší příbuzní Turků. Jejich jazyk – ázerština – se liší od turečtiny asi jako čeština od slovenštiny. Ázerbajdžán = země Ázerů.

(1940–2006), který – údajně v rámci boje proti islámskému radikalismu – rozvinul kult osobnosti v míře nevidané. Prohlásil se za otce všech Turkmenů (Turkmenbaši), napsal knihu, jež se stala povinným výukovým textem ve všech školách i podnikách v zemi. V centru Ašchabadu nechal postavit Archu nezávislosti – jejíž součástí je šedesátimetrový sloup, na němž stojí jeho zlatá socha v nadživotní velikosti, která se během dne otáčí za sluncem... Na druhou stranu, za jeho vlády byl vybudován těžební, chemický a textilní průmysl i dopravní infrastruktura, přičemž zahraniční majetková účast v turkmenských podnikách nesměla přesáhnout 49 %.



Převážná část zahraničních investic v zemi pochází z Německa.

V rámci zdravotnické politiky jsou služby poskytovány turkmenským občanům bezplatně, platí se pouze regulační poplatky. Pro poskytování služeb bylo rozhodnuto postavit v pěti provinciích shodná zdravotnická centra odpovídající západoevropskému standardu. První z nich bylo postaveno v Ašchabadu německými firmami tzv. na klíč. Generálním dodavatelem byla společnost Siemens AG. Zařízení laboratoří, které zákazník požadoval a které nepatřilo do portfolia vlastních výrobků, Siemens jednoduše koupil u výrobce a postavil na místo v laboratoři. A víc nic. Turkmeni je pochopitelně ovládat neuměli a výrobce je přece prodal Siemensu. Nechtě se kolegové dostaví, my je rádi zaškolíme. Že je třeba školení v Ašchabadu? Tak nám uhradte náklady. To se generálnímu dodavateli nelíbilo a navíc by vznikl precedens. A tak vybavení s pořizovací cenou v desetitisících eur stálo na stolních deskách jako pomník bez naděje na řešení. V zoufalých situacích se občas objeví racionální řešení, a to tehdy, když se najde někdo, komu kvetoucí blbost vadí. Tím někým byla Karina Jurjevna Ajrieva, vedoucí zastoupení Roche v Turkmenistánu, čímž bylo rozhodnuto

o spuštění programu HCV Disease Management v Ašchabadu.

První zamýšlený termín mého příjezdu do Ašchabadu v lednu 2007 nevyšel, protože 21. prosince Saparmurat Atajevič Nijazov náhle zemřel na srdeční zástavu a národ pro svého diktátora truchlil. Po skončení státního smutku proběhly nové prezidentské volby, v nichž byl zvolen prezidentem bývalý rektor Státního stomatologického institutu a ministr zdravotnictví ve vládách Turkmenbašihovy éry Gurbanguli Berdymuhamedov. Mezitím mi propadlo vstupní vízum a bylo nutno o něj žádat znovu.

Do Ašchabadu jsem letěl v druhé polovině dubna s tureckými aeroliniemi přes Istanbul, neboť další možná varianta s Lufthansou přes Frankfurt a Baku byla mnohem dražší a navíc i časově delší. Po večerním přistání na letišti v Ašchabadu mne příjemně překvapila nejen moderní budova terminálu, ale i absence dosluhující sovětské letecké techniky. Všechna zaparkovaná letadla turkmenské letecké společnosti byly Boeingy 737 nejnovější modelové řady, která obsluhují mezinárodní linky do Moskvy, Taškentu, Abú Zabí, Almat, Minsku, Amritsaru, Dillí, Petrohradu a Istanbulu a přes 20 vnitrostátních letišť



▲ Obr. č. 5: Před budovou turkmenského Ministerstva zdravotnictví, přezdívanou Kobra

v provinciích. Plánoval se i nákup letadel dálkové flotily. Městská hromadná doprava v Ašchabadu spočívala na obstarožních československých trolejbusích Škoda 9Tr, udržovaných v provozuschopném stavu všemi možnými (i zdánlivě nemožnými) prostředky. V době mé návštěvy tento typ přesluhoval svou plánovanou životnost nejméně o 15 let. Trolejbusy doplňovaly autobusy íránské provenience. Ani automobilní vozový park nebyl nijak bohatý. Kromě silou vůle udržovaných Volh, Lad, Ižů a Záporožců byly vidět pouze Peugeoty 206 a v Dubaji vyráběná SUV Honda. Jsem přesvědčen, že naše obchodní zastoupení v této zemi by bylo přijato s povděkem. Náš velvyslanec sídlící v té době v Moskvě ovšem těžko mohl projevat nějakou iniciativu, a to nejen v obchodní oblasti.

Druhý den svého pobytu jsem se seznámil s Medicínským centrem v Ašchabadu. Jedná se o 6 samostatných pavilonů, v nichž jsou umístěny kliniky a další pracoviště medicínských oborů. I ze stavebního hlediska je jejich provedení perfektní, což v těchto geografických oblastech nebývá pravidlem. Zařízení a přístrojové vybavení je rovněž špičkové. To jsem ovšem ještě netušil, za jakých okolností budu



▲ Obr. č. 4: Jeden z 6 pavilonů Medicínského centra v Ašchabadu



mít příležitost otestovat odbornou úroveň zdravotnického personálu. Celý můj týdenní pobyt měl nabitý program. V laboratoři jsme uvedli do provozu systém COBAS® AmpliPrep™ a COBAS® TaqMan® a zavedli monitorovací testy na hepatitidy a HIV, na COBASu Amplicor jsme zavedli kvalitativní testy na STI a mykobakterie, nacvičili jsme základní obsluhu Light-Cycleru. Musím říci, že všech 7 účastnic školení bylo vysoce kvalifikovaných a manuálně zručných, zvyklých pracovat dle zásad správné laboratorní praxe.

Můj program v Ašchabadu nezahrnoval jen školení. Jako první delegovaný pracovník zahraniční společnosti jsem byl přijat náměstkem ministra zdravotnictví. Byl jsem požádán o přednášku v rámci postgraduálního vzdělávání lékařů, navštívil jsem příslušné Národní referenční laboratoře a provoz Transfuzní služby. Volného času bylo minimum a byl věnován v naprosté většině kulinářským zážitkům turkmenské kuchyně. Několikrát jsem si v hotelu pustil televizi. Pokaždé byl přímý přenos ze zasedání parlamentu. Diskuse byla autoritativně řízena, poslanci byli vyvoláváni předsedajícím, stavěli se do pozornosti a věcně odpovídali. Přítomnost všech v celém průběhu jednání byla naprostou samozřejmostí, odcházet, bavit se nebo snad spát si nedovolil nikdo. Cílenou kritiku přijímali kritizovaní „se sklopenými ušima“, předsedajícím se neoponovalo.

### Přednáška a noc na JIP

Když přišla Karina s nabídkou, že slajdy z mé prezentace přepracují na ruskou

verzi včetně všech popisků, mohl jsem to tušit. Rovněž jsem měl tušit, že kulinářské zážitky z turkmenské kuchyně nezůstanou nepotrestány. Blížil se konec mého týdenního pobytu. Po ranním časném probuzení jsem mohl pouze konstatovat výbuch ve střevě. Vynechání snídaně, resp. její náhrada aktivním uhlím, se mi zdálo jako jediná možná varianta. Dopolední program jsem jakž takž zvládl, nicméně potíže neustupovaly. Na 14.30 jsem

Přednáška začala s 15minutovým zpožděním, protože režisér trval na tom, že přenos začne rozhovorem reportérky se mnou. Po devadesáti minutách prezentace následovala hodinová diskuse. Pak přišel rozhovor pro rozhlas a debata s pišícími novináři. Po třech a půl hodinách jsem se konečně vypotácel ze sálu. Když mi hostitelé navrhli návštěvu lékaře za účelem předpisu opiové tinktury, souhlasil jsem.



▲ Obr. č. 6: Automat pro izolaci nukleových kyselin z biologických vzorků pracující s uzavřeným kazetovým systémem MagNA Pure Compact

měl plánovanou přednášku, a jediné, co mě zajímalo, bylo jak přežít 2 hodiny bez nutnosti odbíhat. Zrušil jsem tedy oběd a připravoval jsem se na hotelovém pokoji. Ve 14.15 jsem vstoupil do kongresového sálu, v němž bylo obsazeno všech 260 míst lékaři z celé země. Navíc zde byly kamery Turkmenské státní televize. Pochopil jsem, že v programu přímých přenosů turkmenské TV střídám parlament.

Na ambulanci sloužil mladý intenzivista. Byl jsem ještě ve dveřích, když určil diagnózu: „Ten? Ten nepotřebuje opiovou tinkturu, ten potřebuje zavodnit. Je strašně dehydrovaný.“ Pak se obrátil ke mně: „Necháme si Vás tu do rána.“ A tak jsem skončil na lůžku jednotky intenzivní péče Medicínského centra v Ašchabadu. Ráno jsem byl propuštěn, zcela fit, takže zbytek mého pobytu proběhl již bez problémů.



#### MUDr. Emil Pavlík, CSc.

Akademický pracovník, Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Studničkova 7, Praha 2. Odborný asistent katedry zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva Fakulty biomedicínského inženýrství ČVUT v Praze se sídlem Sportovců 2311, Kladno. Vedoucí lékař Sérologické laboratoře Ústavu lék. biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN Praha.

Kontakt: epavl@lfl.cuni.cz, pavliemi@fbmi.cvut.cz

Absolvent FVL UK v Praze 1980, obor Všeobecné lékařství, atestace z lékařské mikrobiologie II. stupně 1998, licence ČLK pro vedoucího lékaře-primáře 2000, CSc., v oboru Genetika 2001, školitel PGS v doktorském studijním programu FBMI.