



Tromboembolická nemoc (TEN) je multifaktoriální onemocnění, kdy je při hodnocení rizika trombofilie významné i určení molekulárně genetických znaků. Z nich mají nejzásadnější klinický význam stanovení mutace FV Leiden (1691G>A) a mutace genu pro protrombin (20210G>A). Analyzátor cobas z 480 PCR je zástupcem nejnovější generace rodiny LightCycler® (f. Roche). Byl navržen speciálně pro IVD a má vysoký výkon v kombinaci s vynikající detekcí fluorescenčního signálu. Využívá formát mikrotitrační destičky (max. 96 testů v jednom běhu) a má 6 optických detekčních kanálů. Analyzátor byl testován v molekulárně genetické laboratoři Trombotického centra VFN a 1. LF UK v Praze. Cílem bylo posoudit senzitivitu detekce vzorků s různými kombinacemi genotypů Leidenské (F5), resp. protrombinové (F2) mutace. Z každého vzorku byla vytvořena ředící řada o pěti stupních s klesající koncentrací, přičemž koncentrace posledního ředěného vzorku se již nacházela pod výrobcem doporučeným detekčním dilučním limitem. Z výsledků je patrné, že i vzorky s velmi nízkou koncentrací byly vyhodnoceny správně a bez chybové hlášky.

Výsledky zkušební analýzy přístroje cobas z 480

doc. MUDr. TOMÁŠ KVASNIČKA, CSc., Ing. JAN KUDERNA

Trombotické centrum, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky (ÚLBDL), Všeobecná fakultní nemocnice (VFN) a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy (1. LF UK), Praha

Význam detekce hereditárních trombofilních stavů spojených s TEN

Dle doporučení České společnosti pro trombózu a hemostázu ČLS JEP (www.csth.cz) mají z molekulárně genetických vyšetření při pátrání po trombofilním stavu spojeném s TEN za dnešního stavu vědomostí zásadní klinický význam pouze určení mutace FV Leiden

(1691G>A) a mutace genu pro protrombin (20210G>A). Vyšetření těchto dvou genetických stanovení doporučujeme zdravotnickým zařízením indikovat pouze selektivně:

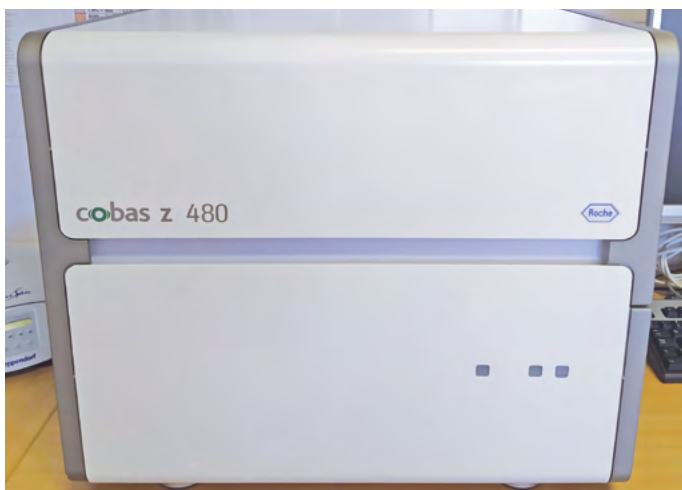
- před zahájením kombinované perorální hormonální kontracepce a/nebo hormonální substituční léčby estrogény (HRT) u žen s pozitivní osobní anamnézou prodělané TEN, nebo s pozitivní rodinnou anamnézou

výskytu TEN u příbuzných v první linii (matky, otce, vlastních sourozenců a dětí probanda);

- u osob se stavem po prodělané idiopatické TEN, při pátrání po vyvolávající příčině a kvůli rozhodování o délce antikoagulační léčby (viz doporučení 9. konsenzu ACCP);
- u žen po opakovaných 3 potratech v 1. trimestru gravidity, nebo u každé ztráty plodu po tomto období gravidity;
- u těhotných žen s pozitivní osobní nebo rodinnou anamnézou prodělané TEN (1. linie příbuzenstva), nebo s komplikacemi v graviditě (při těžkých formách preeklampsie, retardaci plodu anebo po abrupci placenty);
- z jiných indikací po vyšetření v trombotickém centru.

Pozn.: Při pozitivním záchytu uvedených mutací je vhodné provést tato vyšetření i u příbuzných prvního stupně, pokud se u nich vyskytují další rizika spojená s trombofilii (u dětí ale až po 12 letech jejich věku, pokud k tomu nejsou jiné důvody).

Mimo vyšetření FV Leiden (1691G>A) a mutace genu pro protrombin (20210G>A) jsou vyšetření jiných polymorfismů spojených s TEN indikována ve vybraných případech pouze trombotickými centry a provádějí je pouze laboratoře s ověřenou a prováděnou externí kontrolou kvality. Dalším předpokladem



▲ Obr. 1: Analyzátor cobas z 480



▲ Obr. 2: Podavač mikrotitrační destičky



▲ Obr. 3: Čtečka čárového kódu

je dokumentovaná pravidelná vnitřní kontrola kvality u každé série vyšetření.

Analyzátor cobas z 480

Analyzátor **cobas z 480** (obr. 1) slouží k amplifikaci a detekci nukleových kyselin pomocí metody PCR v reálném čase a byl vyvinutý především k aplikacím v oblasti *in vitro* diagnostiky. Analyzátor disponuje až šesti detekčními kanály.

Hardware samotného analyzátoru se kromě připojeného záložního zdroje příliš neliší od LightCycler® 480, stejně jako zásady a postupy správného zacházení s ním. Diody informují uživatele o stavu hardwaru. Podavač mikrotitrační destičky je ovládán jediným tlačítkem, umístěným vedle těchto diod (obr. 2). V módu IVD se mikrotitrační destičky i kit s reagensii načítají do systému přes čárový kód pomocí čtečky, což eliminuje možnost použití reagensii po uplynutí data jejich expirace (obr. 3).

Dále uživatel volí počet vzorků, přičemž první (A1) a druhá (B1) pozice jsou obsazeny pozitivní a negativní kontrolou. Po pojmenování či označení jednotlivých vzorků načtených z LISu uživatel volí typ testu, tedy zda chce analyzovat pouze F2, resp. F5, či jejich kombinaci. Typ testu lze zvolit hromadně vybráním všech vzorků. Vlastní laboratorní práce spočívá ve smíchání pouze dvou reagensii,

fotosenzitivního MasterMixu (F2F5 MMX) a kofaktoru reakce (F2F5 COF). Laboranti mohou být zpočátku zaskočení výrazně vyššími reakčními objemy, kdy se k připravené 25µl směsi přidává 25 µl izolované DNA. Po spuštění PCR běhu zasunutím podavače je již analýza trvající přibližně hodinu a půl a stejně tak i výsledné vyhodnocení dat v režii

samotného analyzátoru a jeho IVD softwaru.

V záložce Results se poté uživatelé zobrazuje, jestli byly kontroly a celkový běh platné, a současně i výsledky pro jednotlivé vzorky. Ty je pak možné exportovat do LISu nebo stáhnout a zálohovat v podobě PDF souboru (obr. 4).

cobas® 4800



cobas F2F5 Test Report

Start of run:	16-Nov-2020 08:53:46	Printed By:	Labmanager
System:	c4-CZC1162X1L	MWP ID:	MD93632305
Serial No.:	z 480: 50427	F2F5 Test Kit-ID #1:	QA2F264990L0039
Test version:	1.0.0	Lot / Exp Date:	F26499 / Jan-2021
Operator:	Labmanager	Comments:	Testing02

Run name 16-NOV-2020 08:53 F2F5

Test status: VALID

Controls

Position	Sample ID	Kit	Control Type	Result	Flags	Accepted by
A01	QA2F264990L0039	1	Positive Control	Valid		
B01	QA2F264990L0039	1	Negative Control	Valid		

Specimens

Position	Sample ID	Kit	Result 1	Result 2	Flags	Accepted by
C01	1.	1	MUT F2	MUT F5		
D01	1.5x	1	MUT F2	MUT F5		
E01	1.10x	1	MUT F2	MUT F5		
F01	1.100x	1	MUT F2	MUT F5		
G01	1.1000x	1	MUT F2	MUT F5		
H01	2.	1	HET F2	MUT F5		
A02	2.5x	1	HET F2	MUT F5		
B02	2.10x	1	HET F2	MUT F5		
C02	2.100x	1	HET F2	MUT F5		
D02	2.1000x	1	HET F2	MUT F5		
E02	3.	1	HET F2	MUT F5		
F02	3.5x	1	HET F2	MUT F5		
G02	3.10x	1	HET F2	MUT F5		
H02	3.100x	1	HET F2	MUT F5		

▲ Obr. 4: Report s výsledky analýzy



Výsledky zkušební analýzy s různými dilucemi vzorků přístrojem cobas z 480

Pro zkušební analýzu a seznámení se s přístrojem bylo vybráno 14 vzorků (tab. 1) s různými kombinacemi genotypů pro Leidenskou mutaci a mutaci protrombinu. Z každého vzorku byla vytvořena ředící řada o pěti bodech s klesající koncentrací. Původní neředěný vzorek o počáteční koncentraci v desítkách ng/μl byl naředěn 5x, 10x, 100x a 1000x, přičemž koncentrace posledního ředěného vzorku se již nacházela pod výrobcem doporučeným limitem (<0,1 ng/μl). Po nahlédnutí do automaticky vytvořeného reportu je patrné, že i tyto vzorky s velmi nízkou koncentrací byly vyhodnoceny správně a bez chybové hlášky.

Závěr

Dle získaných zkušeností je obsluha analyzátoru **cobas z 480** nenáročná a intuitivní, podobně jako u zařízení Light-Cycler® 480. Možnost souběžné PCR analýzy více sledovaných oblastí jistě ocení laboratoře, které provádějí rutinní stanovení dvou nejčastějších genetických

Vzorek č.	Přibližná koncentrace DNA [ng/μl]					Genotyp*	
	Neředěný	5x	10x	100x	1000x	F5	F2
1	18,1	3,6	1,8	0,2	0,02	HOM	HOM
2	79,4	15,9	7,9	0,8	0,08	HOM	HET
3	31,9	6,4	3,2	0,3	0,03	HOM	HET
4	102,2	20,4	10,2	1,0	0,10	HOM	WT
5	34,2	6,8	3,4	0,3	0,03	HOM	WT
6	20,6	4,1	2,1	0,2	0,02	HET	HET
7	43,4	8,7	4,3	0,4	0,04	HET	HET
8	43,4	8,7	4,3	0,4	0,04	HET	WT
9	25,5	5,1	2,5	0,3	0,03	HET	WT
10	30,4	6,1	3,0	0,3	0,03	WT	HOM
11	30,8	6,2	3,1	0,3	0,03	WT	HET
12	37,2	7,4	3,7	0,4	0,04	WT	HET
13	33,3	6,7	3,3	0,3	0,03	WT	WT
14	66,1	13,2	6,6	0,7	0,07	WT	WT

* HOM = mutovaný homozygot, HET = mutovaný heterozygot, WT = wild type homozygot

▲ Tab. 1: Testovací vzorky a jejich genotyp

vyšetření v souvislosti s TEN (mutace faktor V Leiden a mutace pro faktor II protrombin). Ovládání softwaru je velmi logické a zaškolenému laborantovi dává v režimu IVD prakticky nulový prostor pro pochybení či nesprávné nastavení. V UDF (*user-defined workflow*) módu analyzátor slouží jako přizpůsobitelný a univerzální PCR termocyklér s real-time detekcí, který lze využít i pro libovolnou výzkumnou analýzu s vlastnoručně

nastavitelnými protokoly. Analyzátor **cobas z 480** splňuje účel, pro který byl primárně určen, což jsou rutinní diagnostické PCR testy, s rychlým workflow a vysokou senzitivitou detekce i u vzorků s velmi nízkou koncentrací analyzovaného genetického materiálu.

Práce byla podpořena projektem RVO-VFN64165. Použitá literatura k dispozici u autora textu.



doc. MUDr. Tomáš Kvasnička, CSc.

Vedoucí Trombotického centra, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Karlovo nám. 32, Praha 2, www.vfn.cz
Kontakt: tomas.kvasnicka@vfn.cz

Ing. Jan Kuderna

Klinický bioanalytik, Trombotické centrum, VFN, Karlovo nám. 32, Praha 2, www.vfn.cz
Kontakt: jan.kuderna@vfn.cz

