

Modernizace výzkumně-diagnostické laboratoře HIV/AIDS a infekční imunologie



Operační program Praha - Konkurenceschopnost



Fakultní nemocnice Na Bulovce



Univerzita Karlova v Praze

Realizace projektu OPPK

- Projekt je realizován v rámci Operačního programu Praha - Konkurenceschopnost, II. Výzvy, Prioritní osy 3: Inovace a podnikání, Oblasti podpory 3.1: Rozvoj inovačního prostředí a partnerství mezi základnou výzkumu a vývoje a praxí
- Projekt je určen pro Klinikou infekčních a tropických nemocí 1. LF UK a FN Na Bulovce, na níž působí výzkumná a diagnostická laboratoř - Laboratoř HIV/AIDS a infekční imunologie
- Na projektu se podílejí pracovníci FN Na Bulovce i pracovníci 1. LF UK, neboť jde o společné pracoviště obou organizací
- Provoz laboratoře je hrazen ze zdrojů FN Na Bulovce i ze zdrojů 1. LF UK

Cíle projektu

- Modernizace pracoviště - Laboratoř HIV/AIDS a infekční imunologie
- Laboratoř zajišťuje rutinní vyšetření pacientů a podílí se na výzkumu různých aspektů infekčních chorob
- Laboratoř je součástí o klinického, pedagogického a výzkumného pracoviště, ve kterém spolupracují tři kliniky UK a FN Na Bulovce
- Kliniky se jako jediné zdravotnické zařízení na území hl. m. Prahy současně účastní rutinní péče o pacienty, výuce studentů a výzkumu infekčních nemocí
- Výzkumné projekty probíhají ve spolupráci s dalšími pracovišti Univerzity Karlovy, Akademie věd ČR i zahraničními partnery

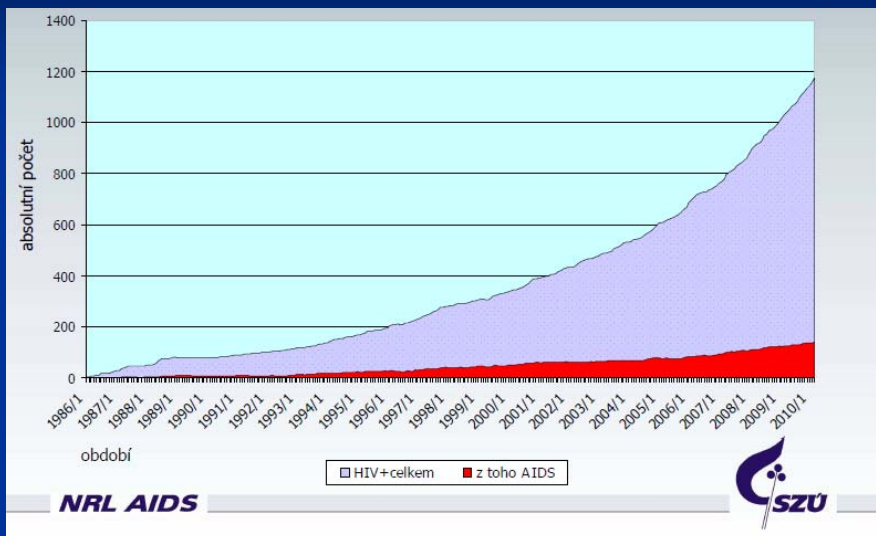
Východiska projektu

- Zvýšená potřeba klinického výzkumu infekčních chorob
- Hlavní zaměření - HIV/AIDS, bakteriální sepsa a virové hepatitidy
- Vyšší na požadavky zlepšení základního imunologického monitoringu pacientů s těmito infekcemi
- Potřeba vychází i z charakteristik uvedeného klinického pracoviště, které je největším referenčním centrem pro infekčně nemocné v ČR

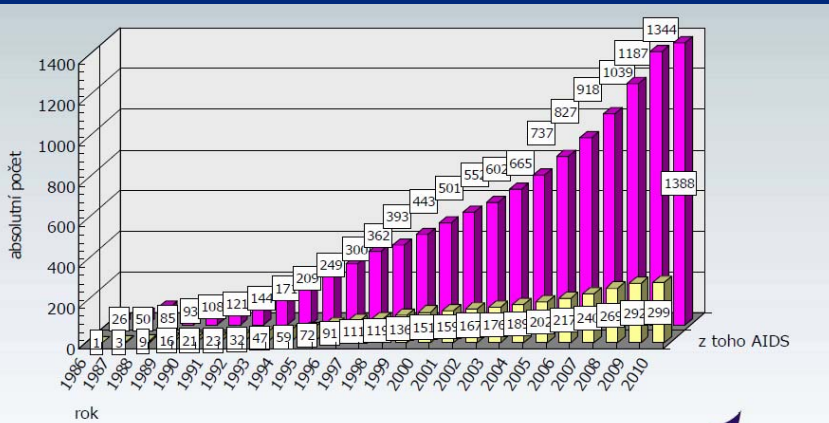
Výstupy projektu

- Pořízení nového průtokového cytometru pro multiparametrickou analýzu
- Výměna zastaralého zařízení
- Oddělení výzkumu a rutinní práce
- Rozšíření kapacit rutinní části laboratoře
- Vzniknou 1-2 nová pracovní místa
- Zvýšení konkurenceschopnosti pracoviště ve vědě
- Vyšší produktivita vědecké práce

Osoby žijící s HIV/AIDS v České republice (situace k 31.3.2010)



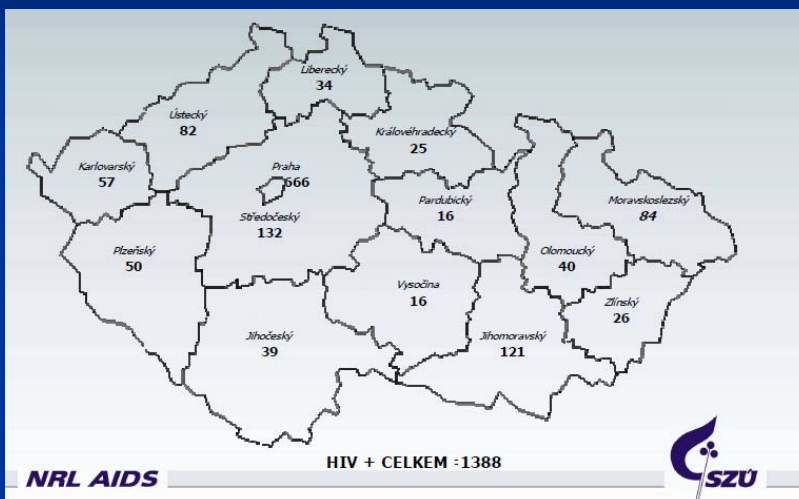
Osoby žijící s HIV/AIDS v České republice (kumulativní počty k 31.3.2010)



NRL AIDS



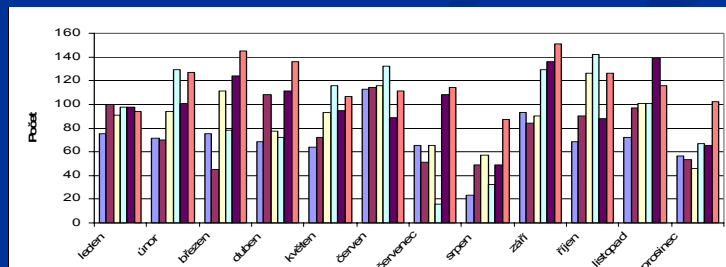
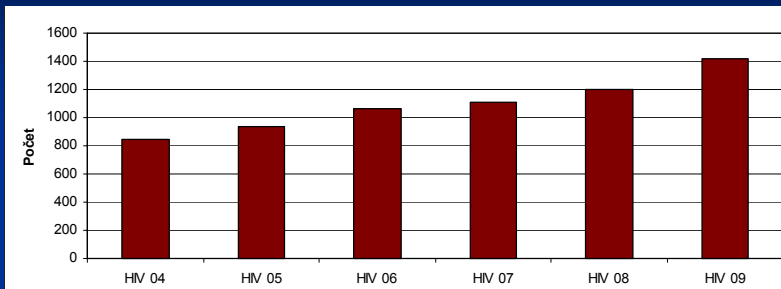
HIV infekce podle kraje bydliště (situace k 31.3.2010)



NRL AIDS



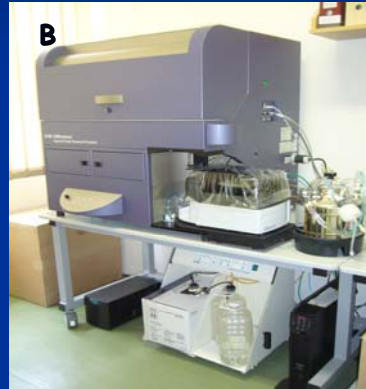
Počty vyšetření lymfocytárních subpopulací (Laboratoř HIV/AIDS a infekční imunologie 2004-2009)



Cytometr LSRFortessa™ v Laboratoři HIV/AIDS a infekční imunologie



Původní (A) a nový cytometr (B)
(BSL-1 laboratoř)



BSL-2 Laboratoř - původní (A) a nová (B) centrifuga



Původní box (A) a nový box (B) s laminárním prouděním (BSL-2 laboratoř)



Grantové projekty řešené v laboratoři (posledních 5 let)

- Molekulární biologie a patologie buňky za normy a u vybraných klinicky závažných patologických procesů,
MŠMT ČR, MSM 0021620806, 1. LF UK (do roku 2012)
- Využití imunologických markerů včetně stanovení exprese Toll-like receptorů v časném určení bakteriálního původu sepse,
IGA MZ ČR NR/9316-3, FN Na Bulovce (ukončeno 2010)
- Studium infekčních chorob a jejich původců,
GA ČR 310/05/H533, 1. LF UK (ukončeno 2009, hodnoceno B)
- Význam funkčních subtypů HIV-specifických CD8+ T-lymfocytů v patogenezi HIV infekce,
GA UK 203428900, 1. LF UK (ukončeno 2009, hodnoceno A)
- Role nadměrné zánětlivé odpovědi v poškození mozku při bakteriální meningitidě a možnosti její modulace,
IGA MZ ČR NR/8014-3, FN Na Bulovce (ukončeno 2006, hodnoceno B)

Nejlepší odborné publikace pracovníků laboratoře (posledních 5 let)

- Beran O, Herwald H, Džupová O, Chalupa P, Holub M. Heparin-binding protein as a biomarker of circulatory failure during severe infections: a report of three cases. Scand J Infect Dis. 2010 Apr 29. [Epub ahead of print].
- Beran O, Lawrence D, O'Neil N, Džupová O, Kalmusová J, Musilek M, Holub M. Sequential Analysis of Biomarkers in Cerebrospinal Fluid and Serum During Invasive Meningococcal Disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Jul;28(7):793-9.
- Holub M, Beran O, Džupová O, Hnyková J, Lacinová Z, Příhodová J, Procházka B, Helcl M. Cortisol levels in cerebrospinal fluid correlate with severity and bacterial origin of meningitis. Critical Care. 2007;11(2):R41,1-9.
- Holub M, Scheinostová M, Fišerová A, Beran O, Kalmusová J, Musilek M, Krížová P. Neisseria meningitidis strains from patients with invasive meningococcal disease differ in stimulation of cytokine production. Folia Microbiologica. 2007;52(5):525-28.
- Bartovská Z, Beran O, Rozsypal H, Holub M. HIV-1-specific CD8+ T cells do not correlate with viral load in HIV-1-positive patients. Acta virologica. 2007;51:59-61.

Řešitelský tým

Michal Holub
Ondřej Beran
Alžběta Davidová
Milan Dvořák

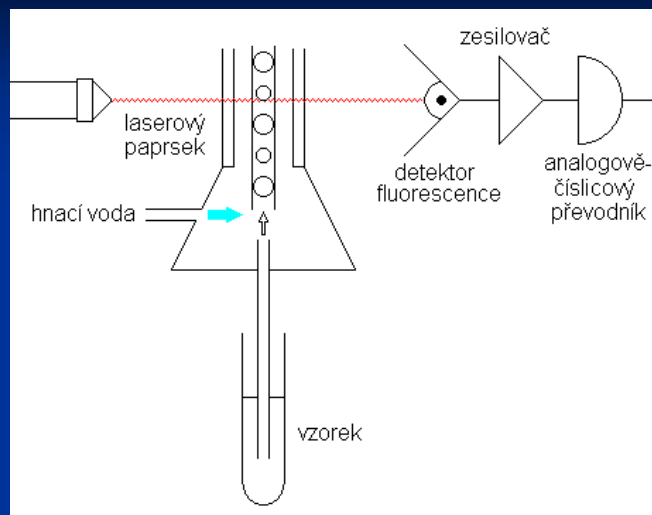
Poděkování

Ing. Eliška Sýkorová
MUDr. Petr Dedek
Ing. Petr Sláma
MUDr. Jiří Spilka
Confima s.r.o.

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

- využití v imunologii, hematologii, onkologii
- nejběžnější aplikace - stanovení lymfocytárních subpopulací

Princip průtokové cytometrie



Jaké parametry a struktury můžeme měřit?

- relativní velikost (Forward Scatter - FSC)
- granularita - vnitřní struktura (Side Scatter - SSC)
- intenzita fluorescence (FL1, FL2, up to FL X)
- ❖ povrchové antigeny
- ❖ proteiny, enzymy
- ❖ hormony
- ❖ nukleární antigeny, DNA, RNA

FSC a SSC



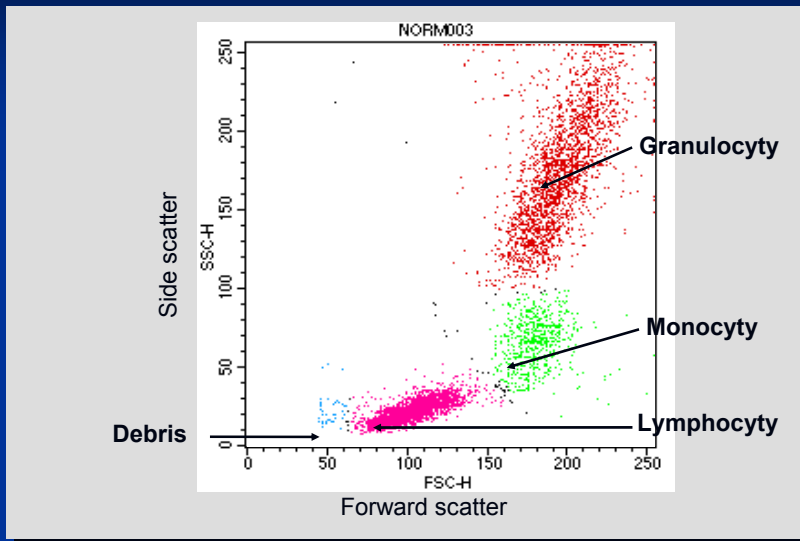
Forward scatter (FSC)

- měřen ve směru přicházejícího světla
- proporční k velikosti buňky

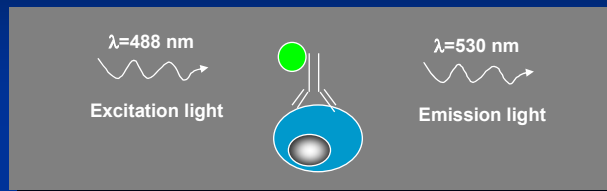
Side scatter (SSC)

- měřen kolmo na směr excitačního paprsku
- proporční ke komplexitě buňky či granularitě

Rozdělení buněk podle odrazu světla



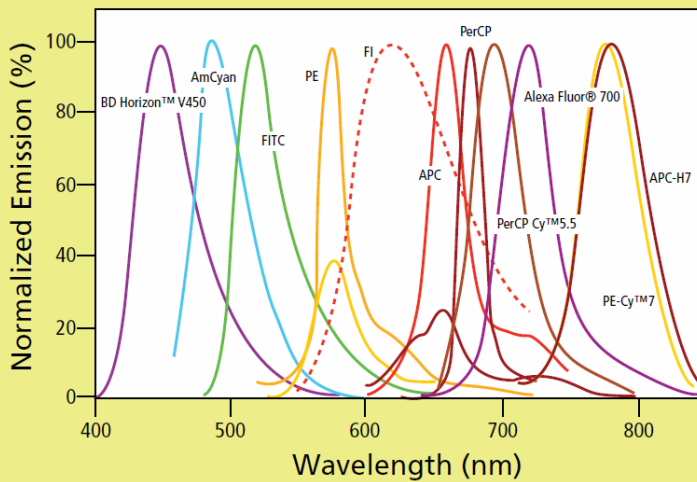
Fluorescence



- molekula fluorochromu absorbuje energii laserového světla
- absorbovaná energie je uvolněna:
 - vibrací a teplem
 - emisí fotonu s vyšší vlnovou délkou (= menší energií)

Princip průtokové cytometrie

Emission spectra of commonly used fluorochromes



Mnohobarevná /multiparametrická/ cytometrie

- > 5 barev
- přesná identifikace buněčných subpopulací pomocí řady markerů /dnes je popsáno již 247 CD antigenů/
 - rozlišení naivních a paměťových T lymfocytů /~ 6-8 barev/
- funkční charakterizace jednotlivých buněk včetně cytokinové sekrece
- charakterizace vzácných populací /antigen-specifických buněk/
- zpřesnění analýzy /eliminace mrtvých buněk/

FACSCalibur™ (r.v. 1998) vs LSRFortessa™ (2010)



- 2 vs 4 lasery
- 4 vs 18 barev
- vyšší rychlost sběru buněk
- analogové vs digitální zpracování