

Úvod do wet lab aspektů experimentů alias správná laboratorní praxe

Petra Vídeňská
videnska@mendelu.cz

WET LAB VS. DRY LAB

Wet lab vs. Dry lab

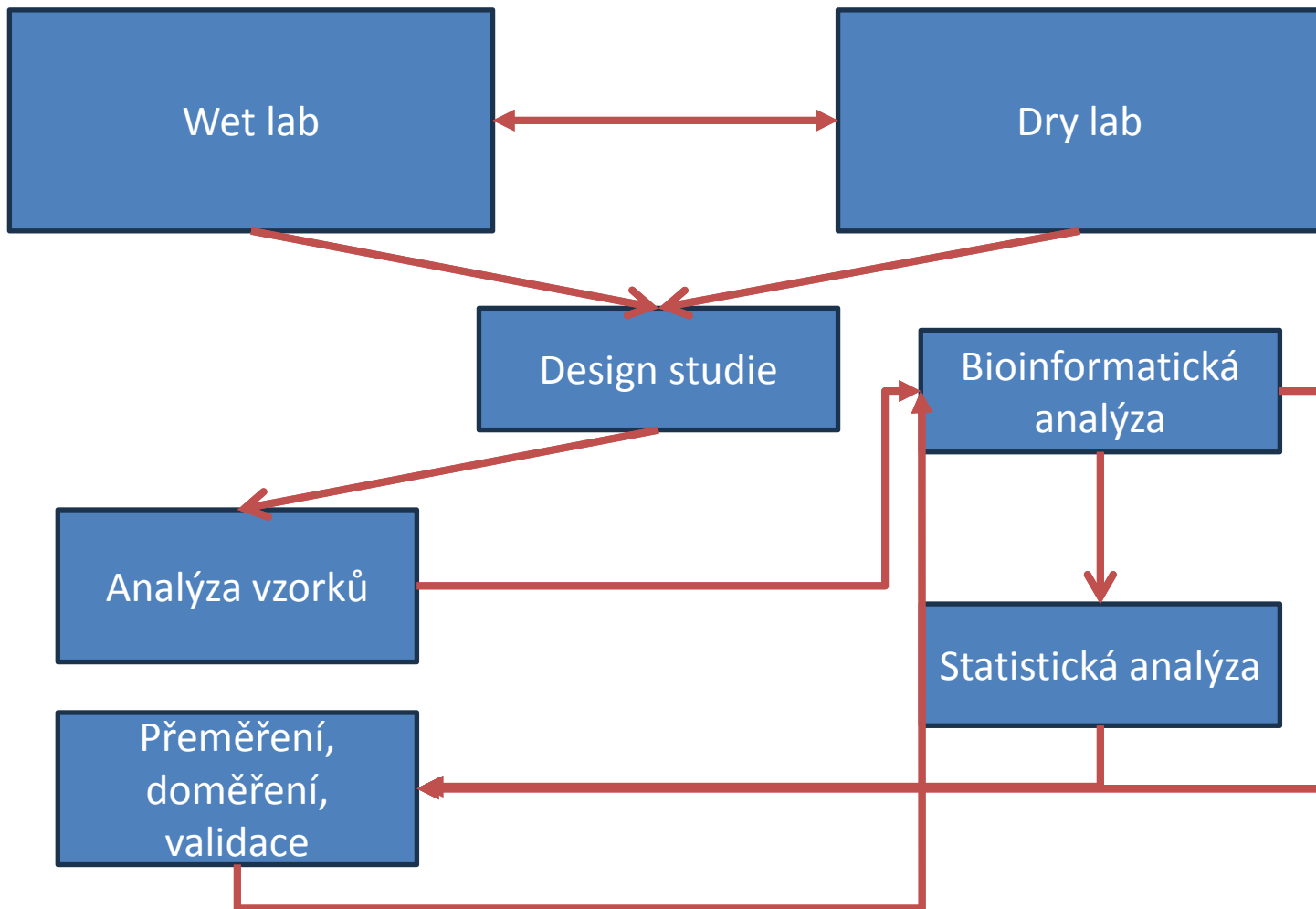
Wet lab

- Fyzická laboratoř pro práci s biologickými, chemickými nebo jinými materiály
- Tvorba „vstupů“ pro Dry lab

Dry lab

- Práce s daty (bioinformatika, statistika), simulacemi a teoretickými modely.

Wet lab vs Dry lab

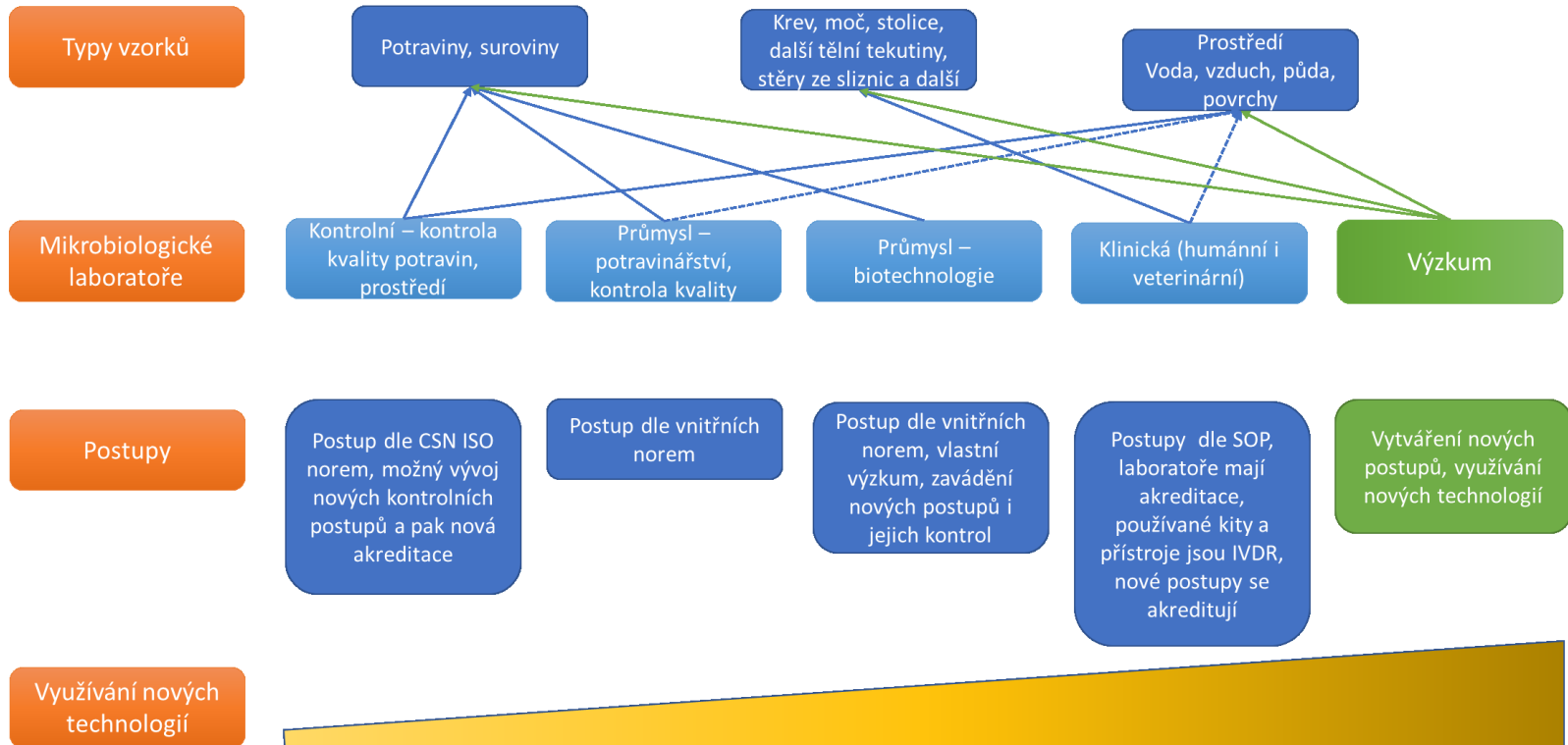


Dry lab význam

- Nové technologie (sekvenátory, hmotnostní spektrometry) produkují velké množství dat, které je potřeba správně zpracovat.
- **Wet lab** a **dry lab** se vzájemně doplňují, ale díky vzrůstajícímu množství dat se v moderním výzkumu stále více času tráví v **dry lab** prostředí, kde se analyzují výsledky.

OD VÝVOJE METODY K AKREDITACI

Různé typy laboratoří potřebují různé přístupy



Od optimalizace k akreditaci

Vývoj nových
metod

Optimalizace
metod

SOP

Validace

Kontrola
kvality

Akreditace



Optimalizace

Cíl: Zlepšení technik a metod, aby byly co nejefektivnější a nejpřesnější.

- **Klíčové kroky:**

- Výběr nejvhodnějších postupů na základě předchozích studií nebo experimentů.
- Úprava metodiky pro konkrétní podmínky (např. upravit teplotu, použít jiné reagensie).
- Testování na malém měřítku s cílem minimalizovat chyby a zvýšit efektivitu.

- **Výsledek:** Optimalizované metody jsou připravené k širšímu použití, ale zatím nejsou plně validované.

SOP

Standardní operační postupy (SOP)

Cíl: Zavedení standardizovaných pokynů pro provádění optimalizovaných metod.

- **Klíčové kroky:**
 - Podrobný popis všech kroků experimentu (od přípravy vzorků po kalibraci přístrojů).
 - Stanovení kontrolních opatření (pozitivní a negativní kontroly).
 - **Zajištění jednotné aplikace metod v celé laboratoři.**
- **Výsledek:** SOP zajišťují, že metoda je prováděna konzistentně napříč různými uživateli.
- **Příklad**

Validace

Cíl: Ověření, že metoda poskytuje spolehlivé a opakovatelné výsledky.

- **Klíčové kroky:**

- Testování opakovatelnosti metody na stejném vzorku vícekrát.
- Ověření přesnosti a citlivosti metody pomocí referenčních materiálů nebo standardů.
- Porovnání s jinými validovanými metodami, aby bylo možné ověřit správnost výsledků.

- **Výsledek:** Metoda je prokázána jako spolehlivá a připravená k širšímu použití v laboratoři.

Kontrola kvality

Cíl: Zajištění, že metoda je při každém použití spolehlivá a stále poskytuje přesné výsledky.

- **Klíčové kroky:**
 - Zavedení interních i externích kontrolních mechanismů (např. pravidelné testování referenčních vzorků).
 - Monitorování dlouhodobé stability metod a pravidelné ověřování přístrojů (kalibrace).
- **Výsledek:** Metoda prochází pravidelnými kontrolami, které zaručují její konzistenci.

Akreditace

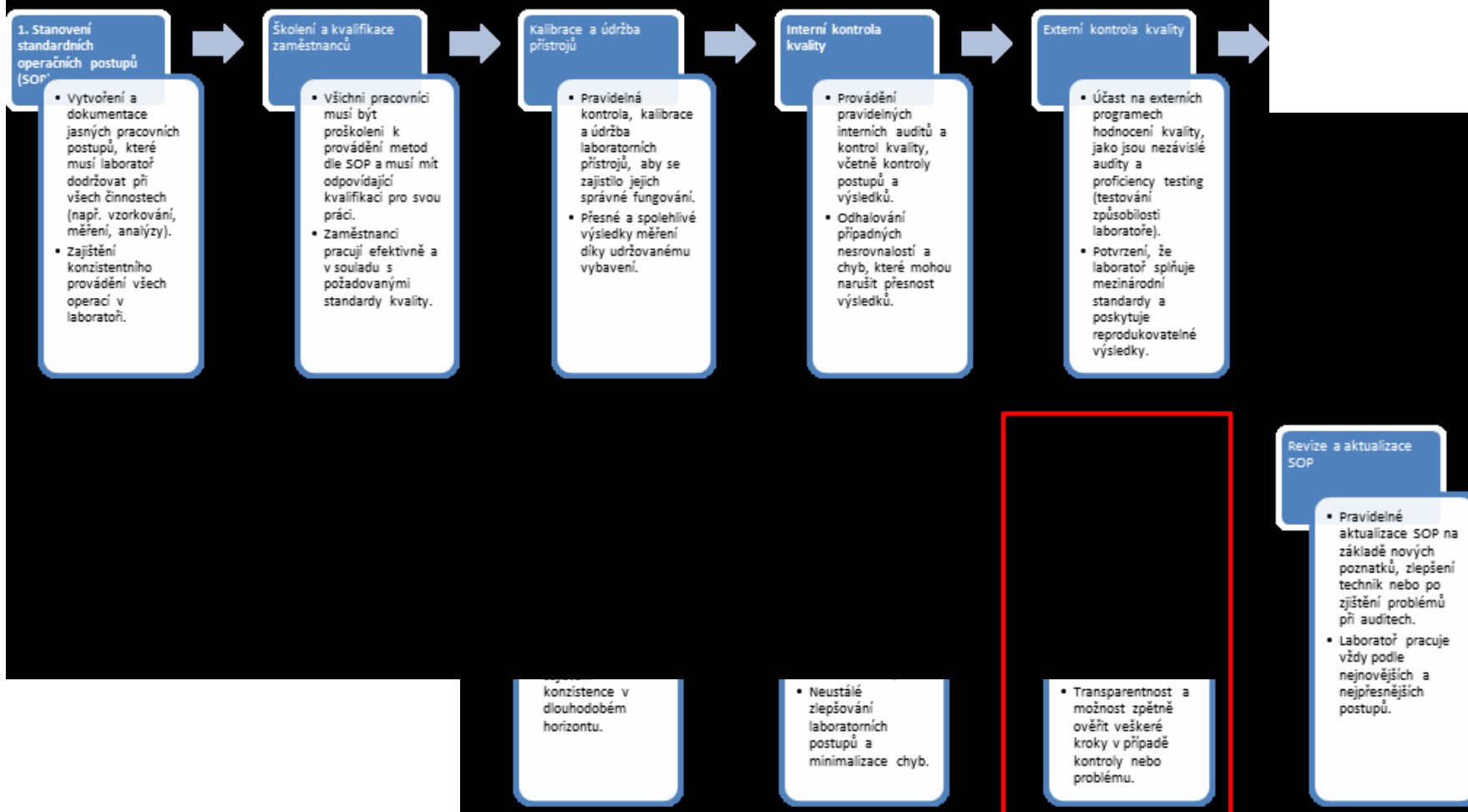
Cíl: Formální uznání toho, že metoda splňuje určité normy a je prováděna v souladu s mezinárodními standardy.

- **Klíčové kroky:**

- Dodržování předpisů a standardů (např. ISO/IEC 17025 pro zkušební a kalibrační laboratoře).
- Externí audit a inspekce nezávislým akreditačním orgánem.
- Zavedení **systemu řízení kvality**, který pokrývá všechny aspekty laboratorní činnosti.

- **Výsledek:** Laboratoř nebo metoda získává akreditaci, což znamená, že její postupy splňují nejvyšší požadavky na kvalitu a reprodukovatelnost.

urovaný
metody
nosti.



SPRÁVNÉ PLÁNOVÁNÍ

Správné plánování

Klíčem k úspěšné studii je
věnovat čas přípravě.

Správné plánování

1. Stanovení hypotézy

- **Dobře naplánovaný experiment:**
 - Hypotéza je jasně formulována a vychází z důkladného průzkumu literatury.
 - **Příklad:** „Přítomnost specifických druhů bakterií v půdě zvyšuje růst rostlin díky lepší fixaci dusíku.“
- **Špatně naplánovaný experiment:**
 - Hypotéza je vágní a nejasná, neexistuje dostatečný průzkum předchozích studií.
 - **Příklad:** „Rostliny by mohly růst lépe s bakteriemi v půdě.“
– chybí přesnost, konkrétní druhy a mechanismus.

Správné plánování

2. Průzkum literatury

- **Dobře naplánovaný experiment:**
 - Pečlivý průzkum literatury zahrnuje aktuální studie, které potvrzují předpoklady a navrhují vhodné metody.
 - **Příklad:** Citování několika studií o fixaci dusíku a identifikace konkrétních mikroorganismů.
- **Špatně naplánovaný experiment:**
 - Omezený nebo žádný průzkum literatury, což vede k nevhodné metodologii nebo opakování již známých chyb.
 - **Příklad:** Přeskočení průzkumu, žádná konkrétní podpora hypotézy.

Správné plánování

3. Výběr metod

- **Dobře naplánovaný experiment:**
 - Zvolená metoda je vhodná pro odpověď na stanovenou hypotézu, založená na validovaných postupech z literatury.
 - **Příklad:** Použití sekvenování DNA k identifikaci mikroorganismů v půdě a měření fixace dusíku.
- **Špatně naplánovaný experiment:**
 - Nevhodná metoda, která není schopná odpovědět na otázky hypotézy.
 - **Příklad:** Použití obecného mikrobiologického postupu bez zajištění specifické detekce fixujících mikroorganismů.

Správné plánování

4. Kontrolní skupiny

- **Dobře naplánovaný experiment:**
 - Správně definované pozitivní a negativní kontrolní skupiny pro ověření správnosti výsledků.
 - **Příklad:** Kontrolní půda bez mikroorganismů (negativní kontrola) a půda s bakteriemi známými pro fixaci dusíku (pozitivní kontrola).
- **Špatně naplánovaný experiment:**
 - Žádné nebo nedostatečné kontrolní skupiny, které by validovaly experimentální data.
 - **Příklad:** Nepřítomnost kontrolních skupin, takže výsledky nelze spolehlivě interpretovat.

Správné plánování

5. Kalibrace přístrojů

- **Dobře naplánovaný experiment:**
 - Přístroje jsou udržovány a pravidelně kontrolovány
- **Špatně naplánovaný experiment:**
 - kontrola není prováděna nebo je provedena špatně, což vede k chybným výsledkům.
 - **Příklad:** Kontaminace v přístrojích, chyby při měření

Správné plánování

6. Správné vedení záznamů

- **Dobře naplánovaný experiment:**
 - Všechny kroky experimentu jsou přesně zaznamenány do laboratorního deníku (papírového nebo digitálního), což zajišťuje možnost opakování experimentu.
 - **Příklad:** Každé měření, změna protokolu nebo pozorování jsou pečlivě zapsány, včetně časových údajů a podmínek.
- **Špatně naplánovaný experiment:**
 - Nedostatečné vedení záznamů, což ztěžuje reprodukci experimentu.
 - **Příklad:** Chybí záznamy o klíčových krocích experimentu, změnách metod nebo podmínkách měření.

Správné plánování

7. Reprodukovatelnost

- **Dobře naplánovaný experiment:**
 - Experiment je navržen tak, aby ho mohl zopakovat jiný tým, a to díky jasné dokumentaci a důkladnému plánování.
 - **Příklad:** Jasně instrukce a dobře vedený deník umožňují jiným vědcům zopakovat experiment se stejnými výsledky.
- **Špatně naplánovaný experiment:**
 - Experiment je těžko reprodukovatelný kvůli nedostatečné dokumentaci, chybám v metodologii nebo chybějícím kontrolám.
 - **Příklad:** Jiný tým nedokáže dosáhnout stejných výsledků kvůli nedostatečným informacím a nepřesnostem.

DESIGN STUDIE

Design studie

- **Ujasnění odebírání a uchovávání vzorků:** Zajistit, že způsob odběru a uchovávání vzorků je v souladu s jinými studiemi.
- **Sběr dalších informací o vzorku:** Nejen informace o vzorku samotném, ale také detaily o pacientovi či prostředí (např. teplota, vlhkost, umístění)
 - dobré promyslet množství informací vs. množství vzorků
- **Projednáání se statistikem:** Statistická podpora je klíčová, aby bylo zajištěno, že design experimentu je robustní a výsledky statisticky validní.
- **Počet vzorků – věda vs. realita:** Vědecký ideál (velké množství vzorků pro statistickou sílu) se často musí přizpůsobit realitě (čas, finance, dostupnost pacientů).
- **Zařazení a vyloučení pacientů (nebo lokalit sběru vzorků):** Definování jasných kritérií pro to, kdo nebo co bude zahrnuto do studie (předcházet chybám a zkreslení)
- **Dotazníky:** Použití již validovaných dotazníků, pokud je to možné, pro zajištění konzistence a spolehlivosti dat.
 - Převzatý vs. vlastní dotazník: Vytváření nových dotazníků je složité, proto je často lepší adaptovat již ověřené formáty.

Design studie

Co dalšího je potřeba vzít v úvahu?

- **Etické aspekty**

- Zvláště důležité v klinických a zvířecích studiích. Výzkum by měl být navržen s ohledem na etiku, což zahrnuje získání informovaného souhlasu účastníků a minimalizaci škod nebo rizik pro subjekty.

- **Pilotní studie**

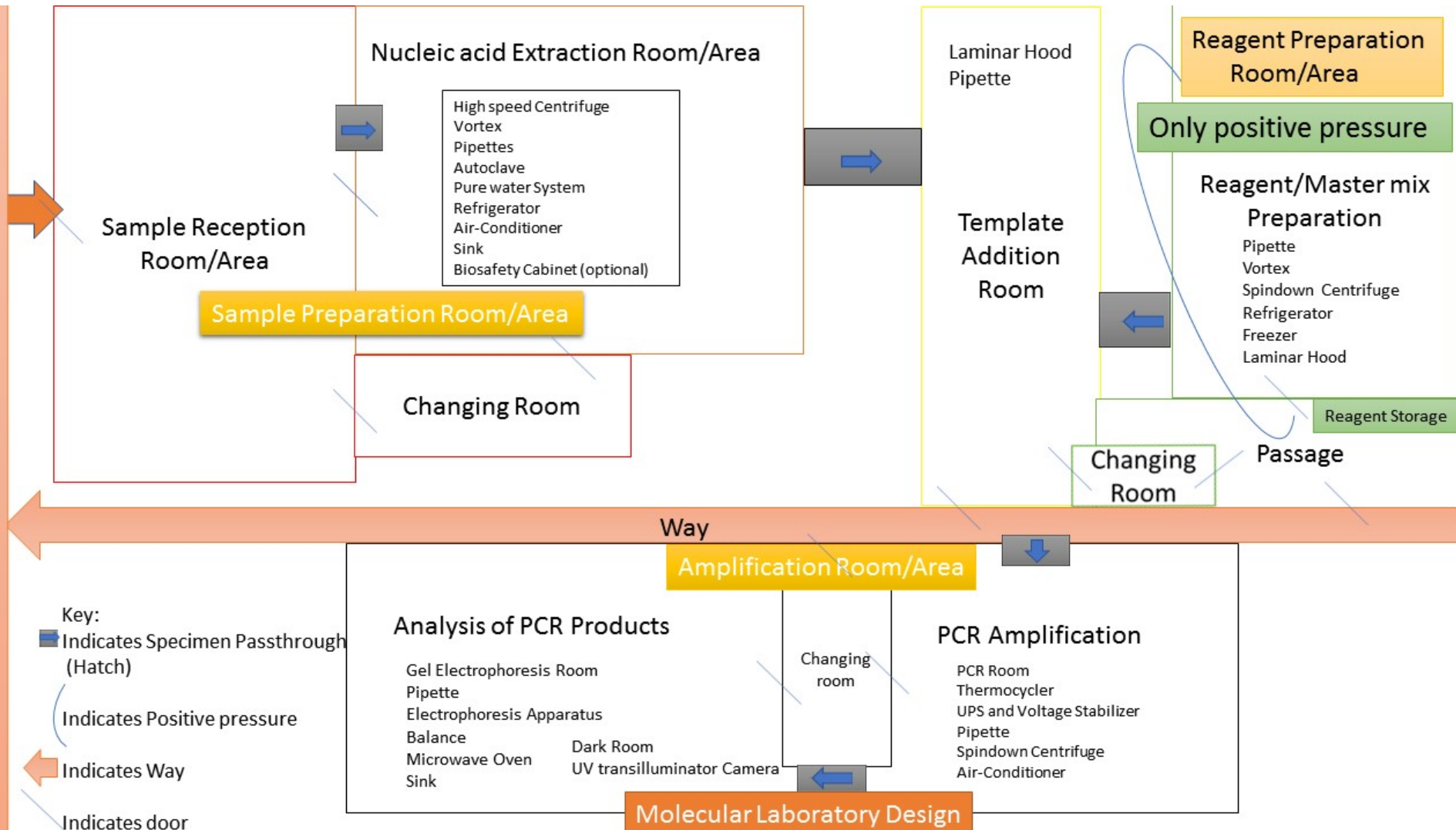
- Malý předběžný experiment, který se provádí před plnohodnotnou studií. Cílem pilotní studie je otestovat proveditelnost experimentu, validovat metodiku a identifikovat potenciální problémy.
- Pomáhá odhalit metodologické chyby nebo problémy s logistikou, což může ušetřit čas a zdroje během hlavní studie.

ORGANIZACE PRÁCE V LABORATOŘI

Organizace práce: Efektivní rozdělení laboratoře/í

- **Zóny v laboratoři:**
 - Laboratoř rozdělena do **specifických zón** podle typu činnosti (např. příprava vzorků, analýza, skladování).
 - **Minimalizace pohybu se vzorky:** Uspořádání laboratoře tak, aby kroky experimentu na sebe logicky navazovaly a vzorky nemusely „cestovat“ po laboratoři, čímž se snižuje riziko kontaminace.
- **Jasná pravidla na viditelných místech:**
 - Pravidla a postupy pro práci a úklid jsou **viditelně vyvěšeny** v laboratoři, aby se zajistilo jejich dodržování.

Organizace práce: Efektivní rozdělení laboroře/í



Organizace práce: Příprava před zahájením práce

- **Naplánování práce předem:**
 - **Teoretický průchod protokolem:** Před vstupem do laboratoře si podrobně projít postup, aby bylo zajištěno, že je vše správně pochopeno a jsou připravené všechny potřebné materiály.
- **Kontrola připravenosti:**
 - Zkontrolovat, zda jsou **všechny reagensie a vybavení nachystány** a zda jsou dostupné všechny pomůcky.
 - Pokud není vše připravené, neprovádět experiment, dokud není k dispozici vše, co je potřeba.

Organizace práce: Udržování pořádku a přístrojů

- **Pravidla pro úklid po práci:**
 - **Pravidelný úklid** pracovní plochy po každém použití a po každé fázi experimentu, aby se minimalizovalo riziko kontaminace a chyb.
 - Pravidla pro přípravu pracovního místa: Vždy začít s čistou plochou, nastavit vše předem.
- **Údržba přístrojů:**
 - Každý přístroj musí mít **jasné pokyny pro použití a údržbu**, které jsou vyvěšené u přístroje nebo snadno dostupné.
 - Vedení **záznamů o údržbě a opravách**: Kdy byl přístroj naposledy čištěn nebo opraven? Kdo provedl údržbu?
 - **Pravidelné kontroly stavu**: Pravidelně kontrolovat stav přístrojů a nástrojů (např. kalibrace, čištění) a zaznamenávat do protokolu.
 - **Příklad**

Organizace práce: Zajištění dostatku materiálu

- **Dostatek materiálu v laboratoři:**
 - Pravidelně kontrolovat zásoby a zajišťovat, že všechny nezbytné reagensie a materiály jsou **k dispozici v dostatečném množství.**
 - Zavedení systému pro **sledování zásob** (např. inventární systém nebo LIMS), který pomáhá předcházet výpadkům.

Organizace práce: Příprava před zahájením práce – check list

Obecné zásady

1. Zásobování a materiály:

- Všechny reagenty a spotřební materiál byly před zahájením experimentu zkontrolovány (**dostupnost a expirace**).
- Materiály a pomůcky byly správně tříděny pro pre-PCR a post-PCR zónu.

2. Bezpečnostní opatření:

- Jsou dodržovány všechny bezpečnostní protokoly, včetně nošení OOP.
- Byla ověřena dostupnost havarijních prostředků (např. neutralizační roztoky, první pomoc).

Organizace práce: Příprava před zahájením práce

PCR Laboratoř – Checklist

- **1. Pre-PCR zóna (Příprava vzorků a reakčních směsí)**
 - 1. Čistota pracovní plochy a vybavení:**
 - Pracovní plocha byla před prací dekontaminována (např. 70% ethanol, UV světlo).
 - Použité pipety byly dekontaminovány a jsou určeny pouze pro pre-PCR práci.
 - Spotřební materiál (špičky, zkumavky) je sterilní a je určen pouze pro pre-PCR zónu.
 - 2. Příprava reagensů a vzorků:**
 - Reagencie jsou správně rozmrazené a připravené.
 - Byly použity filtrační špičky (pro snížení rizika křížové kontaminace).
 - DNA/RNA vzorky byly přidávány naposledy, aby se omezila možnost kontaminace.
 - Všechny zkumavky a reakční směsi jsou označeny podle protokolu.
 - 3. Osobní ochranné prostředky (OOP):**
 - Všechny osoby v pre-PCR zóně mají na sobě OOP.
 - Rukavice byly vyměněny před vstupem do pre-PCR zóny.
 - 4. Záznamy a protokoly:**
 - Vedené laboratorní deníky zahrnují všechny důležité detaily (datum, časy, typ vzorků, použité reagenty).
 - Protokol byl zkontrolován a je připraven pro další kroky.

Organizace práce: Příprava před zahájením práce

- **2. Post-PCR zóna (Amplikace DNA a analýza)**
- 1. **Přesun z pre-PCR do post-PCR zóny:**
 - Všechny pracovní plochy v post-PCR zóně byly dekontaminovány před začátkem experimentu.
 - Pro přechod do post-PCR zóny byly **vyměněny rukavice a laboratorní plášť**.
 - Veškeré použité pipety, zkumavky a další pomůcky jsou určeny pouze pro post-PCR zónu.
- 2. **Umístění a provoz PCR cyklieru:**
 - **PCR cyklier byl zkontrolován** a je v provozuschopném stavu (správně nastavený teplotní profil).
 - Reakční směsi byly správně umístěny do cyklieru.
 - PCR cyklier je umístěn v post-PCR zóně, kde nedochází ke křížové kontaminaci.
- 3. **Analýza výsledků (např. elektroforéza):**
 - Byly použity nové rukavice pro práci s PCR produkty.
 - Agarózový gel byl připraven v post-PCR zóně.
 - Elektroforéza byla provedena s přístroji a materiály určenými pro post-PCR práci.
- 4. **Úklid a údržba:**
 - Pracovní plocha a přístroje byly po ukončení experimentu dekontaminovány.
 - **Záznamy o provedené údržbě přístrojů a sanitaci byly doplněny** do laboratorního deníku.
 - Spotřební materiál (špičky, zkumavky) byl správně zlikvidován dle laboratorních předpisů.

LABORATORNÍ DENÍKY

Laboratorní deníky: Význam

- **Reprodukovatelnost experimentů:**
 - Přesné a pečlivé vedení záznamů umožňuje opakování experimentů jinými výzkumníky za stejných podmínek.
 - Bez pečlivých záznamů může být těžké interpretovat výsledky nebo zjistit příčinu chyb.
- **Sbírání metadat:**
 - Kromě hlavních výsledků je důležité zaznamenávat také **metadata** (např. „vzorek XY po izolaci byl zabarven do žluta“).
 - **Využití v analýzách:** Metadata mohou být následně využita pro statistické analýzy. Mohou například odhalit vzorce, jako je opakující se nízká výtěžnost u určité osoby nebo změny v mikrobiálním složení vzorků izolovaných určitým lotem kitu.
 - **Pomoc při odhalování procesních chyb:** Tyto záznamy mohou pomoci odhalit skryté chyby v procesech nebo vybavení, které mohou ovlivnit výsledky.
- **Optimalizace a SOP:**
 - **Laboratorní deník:** V průběhu optimalizace procesu je důležité dokumentovat všechny změny a zlepšení.
 - **Přepis do SOP:** Jakmile je proces optimalizován, měl by být přepsán do **Standardních operačních postupů (SOP)** a kategorizován, aby byl jednoduše opakovatelný.
 - **Elektronická forma:** Přehledný zápis v elektronické formě usnadňuje následné vyhodnocování a sledování trendů.

Laboratorní deníky: Obsah

1. Základní informace o experimentu

- **Kdo:** Jméno osoby, která provádí experiment.
- **Kdy:** Datum a čas každého kroku experimentu.
- **Co:** Jasný a podrobný popis toho, co bylo provedeno, včetně metod a použitých technik.

2. Použité materiály a vybavení

- **Reagencie a chemikálie:**
 - Názvy použitých látek, šarže a **expirační doby**.
 - Informace o původu reagentů (dodavatel, katalogové číslo).
- **Laboratorní přístroje:**
 - *Použité přístroje a jejich stav (např. kdy byl přístroj naposledy kalibrován).*
 - Specifické nastavení přístrojů (např. teploty, rychlosti, časové intervaly).

3. Procesní kroky

- **Postup experimentu:**
 - Podrobné popisy **každého kroku** experimentu, aby bylo možné jej reprodukovat.
 - Zaznamenání **časů jednotlivých kroků** (např. doba inkubace, časy měření).
- **Odběr vzorků:**
 - Specifikace vzorků, včetně způsobu odběru, uchovávání, identifikace (např. vzorek č. 1, teplota skladování).
- **Přesné sledování kroků:**
 - Například u PCR záznam o přípravě směsí, programování cyklu a parametry cyklu.

Laboratorní deníky: Obsah

4. Sledování kritických parametrů

- **Podmínky experimentu:**
 - Záznam o podmínkách experimentu, jako jsou teplota, vlhkost, pH, atmosférické podmínky apod.
- **Kontroly:**
 - Záznam o použití pozitivních a negativních kontrol, jejich výsledky a hodnocení.
- **Metadata:**
 - Poznámky o jakýchkoli odchylkách nebo neobvyklých pozorováních (např. změna barvy vzorku, změna konzistence).

5. Výpočty a analýza

- **Záznamy o výpočtech:**
 - Všechny potřebné výpočty (např. koncentrace, ředění, množství reagensů).
 - Detailní popis výpočtových kroků včetně vzorců a jednotek.
- **Statistická analýza:**
 - Jaké statistické testy byly použity k vyhodnocení výsledků.
 - Způsob, jakým byly výsledky interpretovány a jak byly analyzovány v kontextu experimentu.

6. Výsledky a jejich interpretace

- **Primární data:**
 - Zaznamenání všech výsledků, včetně surových dat (např. absorbance, naměřené hodnoty).
- **Grafy a vizualizace:**
 - Vkládání nebo odkaz na grafy, obrázky, elektroforetické gely, spektra apod.
- **Interpretace výsledků:**
 - Poznámky o významu výsledků a jejich vztah k hypotéze nebo výzkumné otázce.

Laboratorní deníky: Papírový vs. digitální

Papírové deníky:

- **Výhody:**
 - Snadná dostupnost bez potřeby elektroniky nebo softwaru.
 - Někteří výzkumníci preferují přímý fyzický zápis.
- **Nevýhody:**
 - Obtížná záloha (originál je jediný exemplář).
 - Riziko ztráty, poškození (např. polití, ohněm).
 - Omezená možnost vyhledávání a organizace informací.

Digitální deníky:

- **Výhody:**
 - Snadné zálohování a sdílení dat s ostatními členy týmu.
 - Možnost vyhledávání v dokumentech, organizace dat, vkládání obrázků a grafů.
 - Kompatibilita s dalšími systémy, např. LIMS.
- **Nevýhody:**
 - Potřeba elektronického zařízení (PC, tablet).
 - Závislost na softwaru a případných licencích.
- **Příklad**

Laboratorní deníky: LIMS

LIMS (Laboratory Information Management Systems)

- **Co je LIMS:**
 - **Laboratory Information Management System (LIMS)** je digitální systém, který spravuje všechny aspekty laboratorní činnosti, od správy vzorků přes experimentální data až po výsledky.
- **Funkce LIMS:**
 - **Sledování vzorků:** LIMS umožňuje snadné sledování vzorků během jejich životního cyklu (příjem, analýza, skladování).
 - **Automatizace záznamů:** Umožňuje automatizované zaznamenávání výsledků experimentů a jejich propojení s konkrétními vzorky.
 - **Sdílení dat a zálohování:** Usnadňuje sdílení dat s ostatními vědci a automaticky zálohuje záznamy.
- **Výhody LIMS:**
 - **Rychlé vyhledávání informací,** které šetří čas.
 - Zajišťuje **konzistenci a kvalitu dat** díky automatizaci procesů.
 - Umožňuje **přehlednou správu vzorků** a výsledků v rámci týmu nebo celé laboratoře.
 - **Přímé čerpání strukturovaných dat:** Datoví analytici mohou přímo z LIMS získávat strukturovaná data pro další analýzy, což zjednodušuje a urychluje proces zpracování da

KONTROLY

Vzorky s nízkou abundancí bakteriální DNA

- Často se jedná o vzorky tkání a tělních tekutin
 - Při infekcích způsobených vícero patogeny (špatně se uplatňují klasické metody)
 - Vzorky tumoru apod. (kolorektální karcinom, karcinom prsu)
 - Zdravé tkáně – přirozený mikrobiom? (mozek)
 - Mekonium, mohou to být i různé stěry

Velké množství humánní DNA

- Ve vzorcích se bakteriální DNA může vyskytovat jen desetinách až setinách procent
- Velký problém zejména u celometagenomového sekvenování (musí se odstranit), ale i u sekvenace genu pro 16S rRNA vznikají nespecificity
- Řešení:
 - NEBNext[®] Microbiome DNA Enrichment Kit
 - Použití i na zmražený vzorek
 - Používá se až po izolaci DNA
 - Ultra-Deep microbiome Prep-Molzym
 - Použití na nezamražený vzorek
 - Slouží k izolaci bakteriální a fungální DNA ze vzorku tkáně nebo tělních tekutin
 - MoLYsis[™] complete 5
 - Použití na nezamražený vzorek
 - Odstranění eukar. DNA
 - Degradace bakteriální b. stěny, purifikace mikrobiální DNA
 - Benzonázová metoda
 - Saponiny

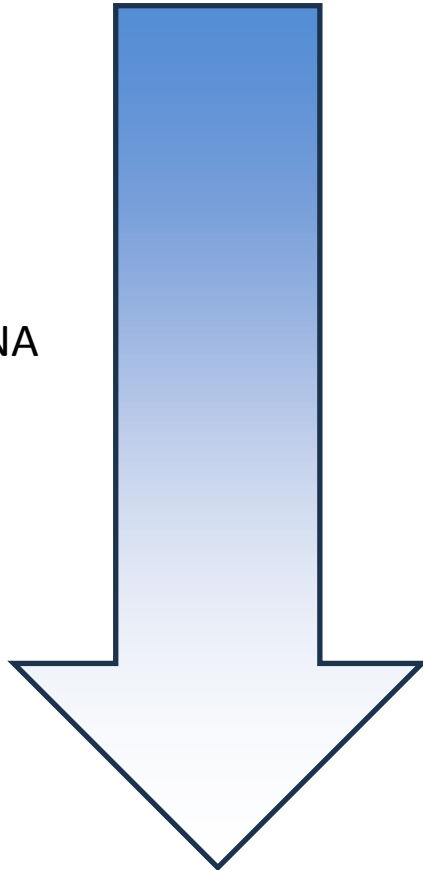
Kontaminace

- Co je pravda a co pouze kontaminace? U vzorků s nízkou abundancí bakteriální DNA se mnohem pravděpodobněji projeví
 - Často u odběru nemožné odebrat naprosto sterilně
 - Kontaminace z lidí a prostředí
 - Kontaminace z kitů
 - Kontaminace ze sekvenátoru
 - ...
- Řešení
 - Negativní kontroly, stěry z prostředí, kontrola kitů, malý počet cyklů u sekvenace genu pro 16S rRNA, vysoká kvalita práce
 - Standardy – mock komunita, nasyntetizovaný interní standard

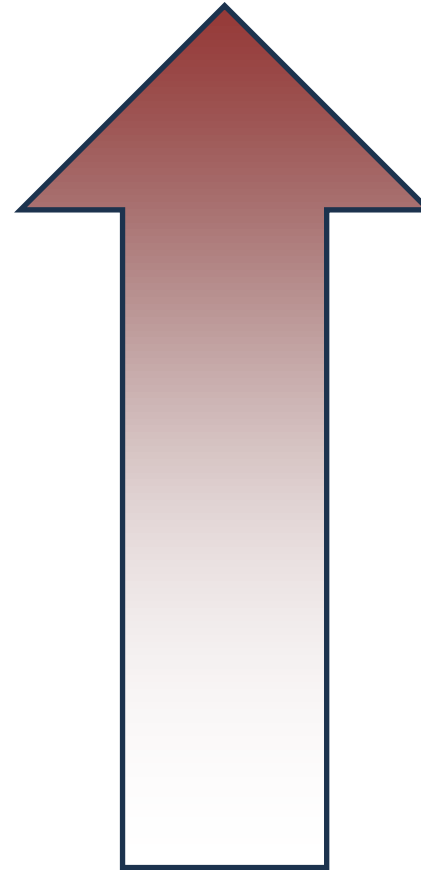
Problém zejména u 16S, kde se kontaminace pomnoží a v podstatě samotný vzorek „přehluší“

Přidávání kontrol k mikrobiomovým studiím

Čím méně
bakteriální DNA
ve vzorku...

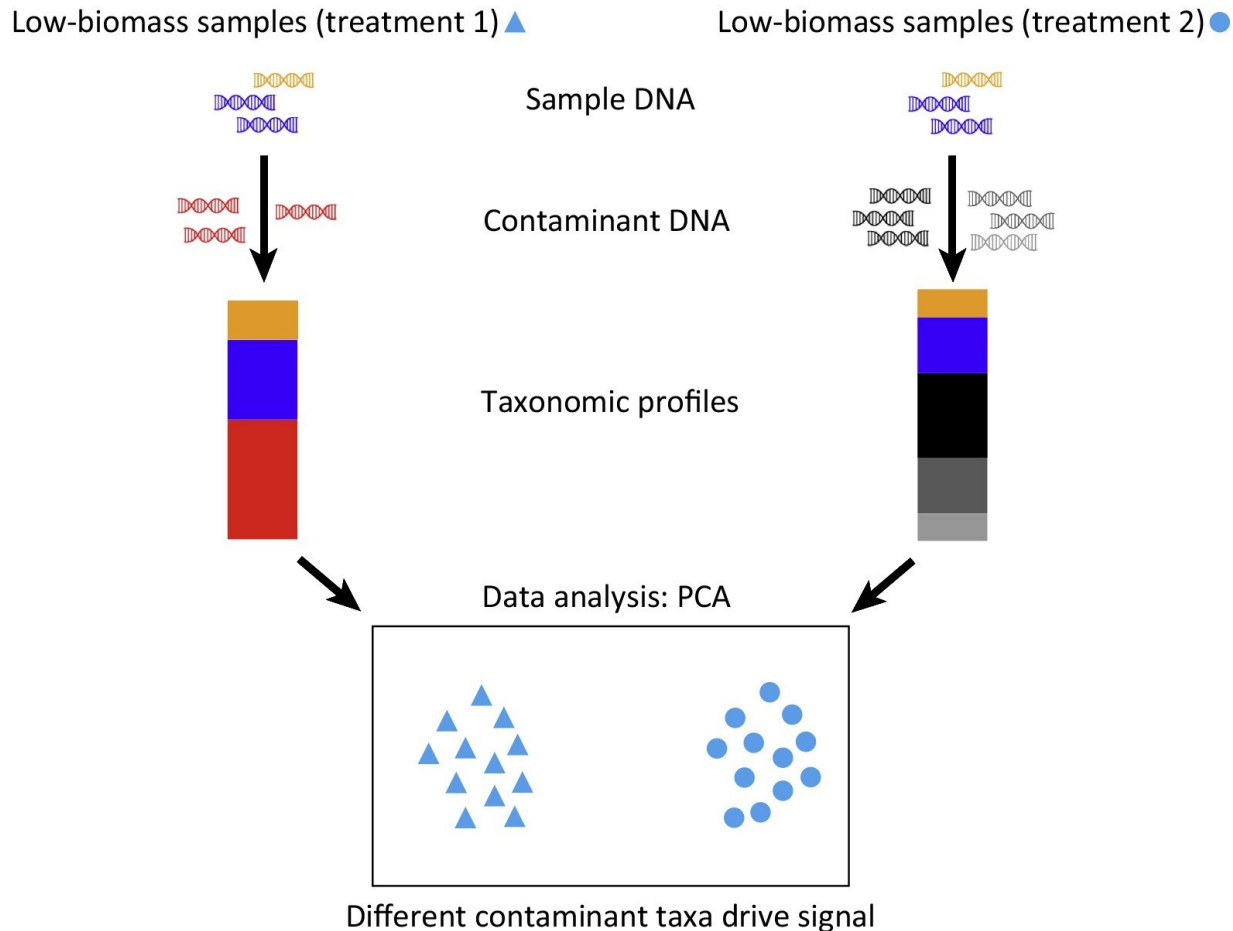


...tím více
pozitivních i
negativních
kontrol

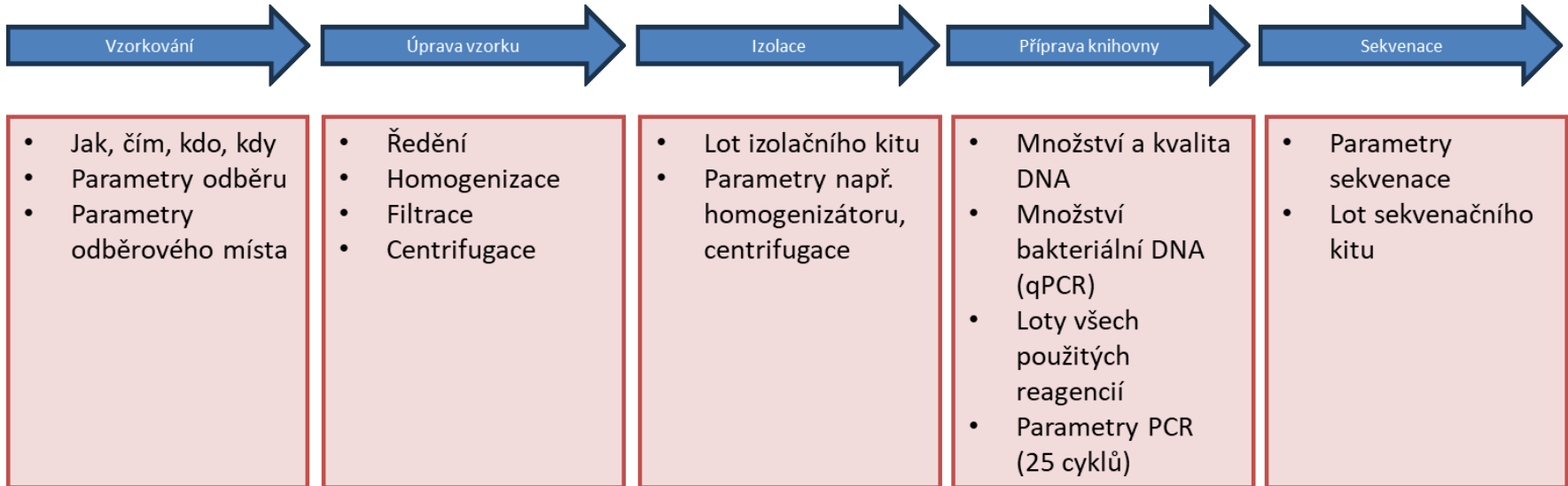


A také se vyplatí více hlídat
procesní kroky – zapisovat
si kdy, kde, kdo a co
izoloval, loty kitů apod.

Kontaminace u vzorků s nízkou koncentrací bakteriální DNA



Procesní kroky



Negativní kontroly

Negativní kontroly

→ kontrola kontaminace

- Kontaminující DNA
- Zkřížená kontaminace

Negativní kontroly

- První a poslední zkumavka
- U destiček 8 jamek
- Pokud se s kontaminací dále pracuje (do vyhodnocování) – 3 opakování

Vzorkování

Úprava vzorku

Izolace

Příprava knihovny

Sekvence

- SBC, Sampling blank control
- Umožňuje odlišit kontaminaci ze vzorkovací lokality a odběrového vybavení

Kontaminace aditiv (ředícího roztoku, homogenizačních kuliček, plastu)

Kontrola kontaminace izolačních kitů, reagensů a prostředí

NTC, No Template Amplification Control
Kontrola reagensů, prostředí a vybavení

Kontrola procesu sekvenace

- Kontrolní stěry použitého vybavení a prostředí
- Výplach použitého plastu
- Otevřená zkumavka během odběru, následně vypláchnutá

- Ředící roztok
- Opláchnuté homogenizační zařízení

- Izoluje se bacterial DNA free voda, musí probíhat zároveň s izolací vzorků!

- PCR s bacterial free vodou
- Výsledky qPCR pro 16S rRNA – rozdíl mezi negativní kontrolou a vzorkem

- Sekvence knihovny připravené s PCR bacterial free vodou

NK vzorkování, SBC

NK Úpravy vzorků

NK extrakce DNA

NK přípravy knihovny a sekvenace

Pozitivní kontroly

Pozitivní kontroly

→ kontrola procesu

- Cílem je získat očekávaný výsledek
- Mohou být zpracovávány „vedle“ vzorku (klasické PK), nebo se přidávají ke vzorku (spike-in kontroly)

Pozitivní kontroly

- Celulární - bakteriální směs (Cellular Mock Community)
- DNA standard
 - DNA izolovaná z mikroorganismů
 - Syntetická sekvence

Vzorkování

Úprava vzorku

Izolace

Příprava knihovny

Sekvence

- Teoreticky lze přidat celulární spike-in pozitivní kontrolu již ke vzorku při odběru (ovlivnění vzorku transportem, skladováním), ale nedělá se často

- Kontrola klasická, celulární mock komunita, izoluje se stejně jako vzorky
- Celulární spike-in kontrola, přidá se ke vzorku před první úpravou vzorku

- Klasická DNA mock komunita, kontrola PCR, následně jde do sekvenace
- Spike-in kontrola

- Kontrola procesu sekvenace
- interrun kontrola, komplexní vzorek, který se dává do všech runů, u stolice jde koupit, připravuje se stejně jako klasická DNA mock komunita

PK vzorkování

PK Úpravy vzorků a extrakce DNA

PK přípravy knihovny a sekvenace

Porovnáním PK z extrakce a z přípravy knihovny lze zjistit, kde dochází ke zkřížené kontaminaci. Z rozdílu účinnosti PCR PK a NK lze vypočítat cutoff pro vyřazení vzorků z analýzy.

Pozitivní kontroly – klasické

- Zpracovávají se jako vzorek
- Slouží i k optimalizaci procesu, pomocí série ředění lze zjistit limity detekce, účinnost extrakce atd.
- Může pomoci odhalit zkřížené kontaminace a chyby v procesu
- DNA mock komunita pro kontrolu přípravy knihovny se považuje již za standard a bývá vyžadována při publikacích

Pozitivní kontroly – Spike-in

- Přidávají se do vzorku
- Mohou být i celulární (využití při extrakci) nebo DNA (lépe syntetická)
- Výhody:
 - Pomohou připravit knihovnu i ze vzorků s nízkým množstvím bakteriální DNA
 - Kontrola inhibice PCR
 - Lze využít při odstraňování kontaminace bioinformaticky
 - Jedna kontrola pro bakterie i houby – může pomoci zjistit vzájemný poměr těchto dvou skupin MO ve vzorku
 - Kvantifikace?
- Vlastnosti
 - Sekvence kontroly musí být odlišná od sekvencí přítomných ve vzorcích
 - Musí být přibližně stejně dlouhá

Osvědčené postupy

- Bacterial PCR free reagencie, zejména voda
- Dekontaminace reagencií – zbavení se bakteriální DNA, zejména u master mixu pro PCR
- Alikvotace všech reagencií (po otevření rychle dochází ke kontaminacím)
- Oddělení prostor
- Vysoký standard úklidu a používání prostředku pro eliminaci DNA jak na površích, tak uvnitř boxů apod.
- Vše otvírat až v boxu
- Nikdy nevyndávat věci z boxu a zase je vracet
- Před otevřením jakékoliv zkumavky stočit (aerosol na víčku)

Kontrolní minimum

- Negativní kontrola extrakce
- DNA pozitivní kontrola klasická – mock komunita
- Doporučení:
 - interrun kontrola
 - Negativní kontrola přípravy knihovny (PCR, nejenom ji udělat, to se předpokládá vždy, ale i osekvenovat)

Vzorky s nízkou náloží bakteriální DNA

- Náročný experimentální design, nutno promyslet dopředu zavedení všech kontrol a jejich počet
- Počet kontrol je na zvážení, výrazně prodražuje experiment – je potřeba na to myslet již v žádosti o grant apod.
- Je potřeba počítat s tím, že bude potřeba hodně vzorků vyřadit z analýzy, protože nebude rozdíl mezi vzorkem a negativní kontrolou
- Vyžaduje náročnou optimalizaci procesů a zvýšený standard práce → zvýšené náklady
- Ideální je i pracovat s kity, které jsou bacterial DNA free → zvýšené náklady

Máme spoustu kontrol a co pak s tím?

- Porovnáním kontrol a vzorků se zjistí množství kontaminace, problematické je, že se může u každého batche vzorků lišit (dle data, personálu, lotu..).
- V případě zjištění limitu detekce pomocí pozitivních kontrol lze vypočítat jaké vzorky vyřadit.
- Kontaminující taxa se sice doporučuje vyřadit, ale ne vždy je to jednoduché, protože mohou být i přirozeně ve vzorku. Navíc při větším množství negativních kontrol je těchto taxonů detekováno velké množství a jsou variabilní.
- Kontaminující taxa se mohou pouze reportovat a opatrně interpretovat, když jsou to zároveň taxa signifikantní ve statistických analýzách.
- Existují bioinformatické nástroje, které upravují data podle výsledků kontrol (je potřeba dopředu si promyslet, zda chci nějaký tento nástroj použít a přizpůsobit tomu výběr kontrol) nebo využívají bioinformatického modelování. Nástroje se značně liší v přísnosti, která taxa odstraňují a která ne.
- **Nastavení jakýchkoliv cutoffů je náročné a nejsou jasná pravidla.**