

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Posouzení citlivosti, specifity a přesnosti
identifikace nefermentujících Gram-negativních
tyčinek pomocí PCR-HRMA**

Diplomová práce

Bc. Lucie Navrátilová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: MUDr. Vladislav Raclavský, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně. Všechny prameny, ze kterých jsem čerpala při vypracovávání této práce, řádně cituji a uvádím úplný odkaz na příslušný zdroj.

V Olomouci dne

Podpis:.....

Poděkování

Děkuji MUDr. Vladislavu Raclavskému, Ph.D. za cenné rady, připomínky a odborné vedení během tvorby mé diplomové práce.

Dále děkuji Ing. Lence Ruskové, Ph.D. za sběr vzorků z klinické praxe, Mgr. Kristýně Hricové za ověření identifikace kmenů, u kterých se vyskytly diskrepance mezi identifikací konvenčními fenotypovými metodami a PCR-HRMA a Petře Procházkové za pomoc při dodělávání doplňkových testů.

Tato práce byla prováděna mj. s podporou výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSM6198959223) a vnitřního grantu LF UP (LF_2011_002). Při práci byla také využita infrastruktura Ústavu molekulární a translační medicíny podpořeného v rámci operačního programu Věda a výzkum pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Souhrn

Mikrobiální infekce vyžadují rychlé a přesné metody detekce a identifikace původce nákazy. Tyto metody jsou založeny buď na posouzení fenotypu, nebo genotypu. Fenotypové metody sledují zejména fyziologické a biochemické vlastnosti, zatímco genotypové metody jsou založené na faktu, že sekvence DNA různých druhů bakterií dosahují v odlišných částech genomu rozdílné variability, kterou lze posuzovat rozličnými technikami. Na zmíněných rozdílech lze založit přesnou genetickou identifikaci bakterií.

Předložená práce shrnuje dostupné literární zdroje ve studované oblasti a dokumentuje vývoj metody identifikace pomocí PCR s následnou analýzou tání s vysokým rozlišením (*High resolution melting analysis*, HRMA). V experimentální části pak posuzuje použitelnost HRMA v identifikaci bakterií ve srovnání s rutinními fenotypovými metodami. Terčem PCR amplifikace, která předcházela HRMA, byly variabilní oblasti 16S rDNA genu. Práce prokazuje použitelnost této techniky pro identifikaci nefermentujících Gram-negativních tyčinek, které způsobují problémy u specifické skupiny nemocných trpících cystickou fibrózou, případně chronickou obstrukční plicní nemocí. Automatizovaná, rychlá a přesná genetická identifikace těchto druhů bakterií je potenciálně velkým přínosem pro tuto skupinu nemocných.

Klíčová slova: identifikace bakterií, PCR, HRMA, 16S rDNA, cystická fibróza, chronická obstrukční plicní nemoc

Summary

Microbial infections require fast and exact techniques for detection and identification of etiological agent. These techniques rely either on phenotyping or genotyping. Phenotypic techniques mainly evaluate physiological and biochemical characteristics, whereas genotypic techniques are based on fact that DNA sequences of different bacterial species show different degrees of variability in different parts of genome, which can be evaluated by various approaches. The differences established then allow for accurate genetic identification of bacteria.

This work summarises available published resources in this field and documents the development of identification based on PCR followed by high resolution melting analysis (HRMA). In its experimental part, practicability of HRMA in bacterial identification compared to routine phenotypic techniques is being evaluated. Variable regions of the 16S rDNA gene were targeted by PCR preceding HRMA. This work demonstrates usefulness of this technique for the species identification of non-fermenting Gram-negative rods that cause problems to the specific group of people suffering cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease, respectively. Automated, rapid and accurate genetic identification of these species should be potentially highly beneficial for this group of patients.

Keywords: bacterial species identification, PCR, HRMA, 16S rDNA, cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	9
2.1 MOŽNOSTI IDENTIFIKACE BAKTERIÍ V LÉKAŘSKÉ MIKROBIOLOGII	9
2.1.1 Fenotypové metody identifikace bakterií	9
2.1.2 Molekulárně-genetické metody v lékařské mikrobiologii.....	12
2.1.3 Polymerasová řetězová reakce.....	13
2.1.4 Genotypové metody v klinických laboratořích	17
2.1.4.1 Genotypové metody pro identifikaci mikroorganismů	18
2.1.4.2 Genotypové metody pro typizaci mikroorganismů	19
2.1.4.3 Analýza tání s vysokým rozlišením.....	22
2.1.4.4 Využití analýzy tání	25
2.2 GRAM-NEGATIVNÍ NEFERMENTUJÍCÍ TYČINKY	35
2.3 VYBRANÁ ONEMOCNĚNÍ.....	36
2.3.1 Cystická fibróza	36
2.3.2 Chronická obstrukční plicní nemoc	40
3. CÍLE PRÁCE	41
4. MATERIÁL A METODY.....	42
4.1 MATERIÁL.....	42
4.2 REAGENCIE	43
4.3 LABORATORNÍ VYBAVENÍ A SOFTWARE	44
4.4 METODY.....	45
4.4.1 Kultivace bakterií	45
4.4.2 Izolace DNA komerčním kitem.....	45
4.4.3 Tepelná izolace bakteriální DNA.....	46
4.4.4 PCR s následnou analýzou tání.....	46
4.4.5 Barvení dle Grama.....	47
4.4.6 Test na stanovení aktivity oxidasy	47
4.4.7 Ověření identifikace kmenů s výskytem diskrepancí v identifikaci různými metodami.....	48
4.4.8 Stanovení citlivosti, specifity a přesnosti konvenční fenotypové identifikace a PCR-HRMA	48
5. VÝSLEDKY.....	49
5.1 SROVNÁNÍ IZOLACE DNA KOMERČNÍ SOUPRAVOU A POMOCÍ TEPELNÉ IZOLACE.....	49

5.2	16S RDNA GEN – OBLASTI NASEDÁNÍ POUŽITÝCH PÁRŮ PRIMERŮ	50
5.3	ALGORITMUS IDENTIFIKACE	50
5.3.1	Rozlišení v rámci <i>Pseudomonas</i> sp.	54
5.4	PODPOŘENÍ IDENTIFIKACE POMOCÍ BARVENÍ DLE GRAMA A TESTU NA STANOVENÍ AKTIVITY OXIDASY	55
5.5	OVĚŘENÍ IDENTIFIKACE POMOCÍ AUTOMATICKÉHO SYSTÉMU PHOENIX	56
5.6	VÝHODNOCENÍ CITLIVOSTI, SPECIFITY A PŘESNOSTI KONVENČNÍ FENOTYPOVÉ IDENTIFIKACE A PCR-HRMA	58
6.	DISKUSE	60
7.	ZÁVĚRY	65
8.	POUŽITÁ LITERATURA	66
9.	POUŽITÉ ZKRATKY	74
10.	PŘÍLOHY	
10.1	DRUHY BAKTERIÍ POUŽITÉ VE STUDII TANG A KOL., 1998	
10.2	DVA VZORY IDENTIFIKACE BAKTERIÍ PODLE CHAKRAVORTY A KOL., 2010	
10.3	BAKTERIÁLNÍ DRUHY POUŽITÉ VE STUDII CHAKRAVORTY A KOL., 2010	
10.4	DRUHY BAKTERIÍ POUŽITÉ VE STUDII YANG A KOL., 2009	
10.5	DRUHY BAKTERIÍ POŽITÉ VE STUDII CHAKRAVORTY A KOL., 2007	
10.6	DRUHY BAKTERIÍ POUŽITÉ VE STUDII CHENG A KOL., 2006	
10.7	POSTUP PRÁCE PRO RYCHLOU DETEKCI A IDENTIFIKACI 25 KLINICKY DŮLEŽITÝCH BAKTERIÁLNÍCH DRUHŮ	
10.8	DRUHY KVASINEK POUŽITÉ VE STUDII BERGMAN A KOL., 2007	
10.9	BAKTERIÁLNÍ RODY POUŽITÉ VE STUDII MELLMANN A KOL., 2008	
10.10	SCHÉMA IDENTIFIKACE GRAM-NEGATIVNÍCH RODŮ	
10.11	KOMPLETNÍ SEZNAM KMENŮ POUŽITÝCH VE STUDII	

1. ÚVOD

Bakteriální infekce vyžadují rychlé a přesné metody detekce a identifikace infekčního agens a případnou automatizaci postupů. Identifikace je složitý proces, jehož výsledkem je určení rodu, druhu až bakteriálního kmene, izolovaného z klinického materiálu, s cílem zjistit složení bakteriální flóry ve vzorku, rozpoznat případného původce nákazy a posoudit jeho možný podíl na onemocnění pacienta (Kůdela a kol., 2002). V dnešní době do této oblasti spadá i bioterorismus, kde je důležitá rychlá identifikace, např. *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* a *Franciscella tularensis* (O'Hara, 2005).

Metody identifikace organismů jsou rozděleny do 2 kategorií – (I.) analýza souhrnu fenotypových (zevních) znaků jedince (fenotypové metody) a (II.) analýza genomu organismu (genotypové metody) (Zaidi a kol., 2003).

V lékařské mikrobiologii mají stále velký význam fenotypové metody založené na sledování fyziologických a biochemických vlastností, které jsou určeny vzájemným působením genotypu a prostředí. Nedostatky fenotypové identifikace mikroorganismů vedly k vývoji metod založených na sekvenci DNA, tzv. genotypových metod, kdy jsou minimalizovány problémy typologie a reprodukovatelnosti a v některých případech umožňují vznik databází referenčních (charakteristických) organismů, knihoven klonů a fylogenetických stromů (Olive a Bean, 1999; Amann a kol., 1997).

Původ genotypových metod je v moderní biologii, kde je základním kamenem struktura DNA, popsána Watsonem a Crickem v roce 1953. Poznatky v této oblasti vedly k rozvoji molekulární biologie, která v současné době nachází uplatnění v mikrobiologii a vychází především z primární struktury jaderné DNA a ribozomální DNA (rDNA) a vede až k sekvencování genomů, kterým se zabývá genomika. Kompletní znalost genomu mikroorganismu může podat informace o biologii buňky.

Vývoj lékařské bakteriologie je možné rozdělit do dvou fází – (I.) pre-molekulární a (II.) molekulární. Studium *Escherichia coli*, které začalo v polovině 20. století, vedlo k mnoha objevům a konceptům v molekulární biologii, které v posledních letech nabývá na významu v diagnostických laboratořích. Tato oblast výzkumu také přispívá k našemu porozumění interakce mezi prostředím, hostitelem a mikroorganismem (Sussman, 2001).

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Možnosti identifikace bakterií v lékařské mikrobiologii

Cílem lékařské mikrobiologie je záchyt, detekce a identifikace etiologického agens (mikroorganismu), které způsobuje onemocnění. Možnosti jeho průkazu jsou přímé a nepřímé. Přímý průkaz je zaměřen na mikroorganismus, jeho části nebo exoprodukty ve vyšetřovaném vzorku. Nepřímý průkaz je založen na stanovení specifických protilátek proti mikroorganismu v séru pacienta (Votava, 2005).

V dnešní době se identifikace opírá hlavně o fenotypové znaky/vlastnosti bakterií. Od 80. let 20. století se při identifikaci bakterií postupně více uplatňují metody, které analyzují produkty cílového mikroorganismu (např. polyaminy, proteiny, lipidy, mastné kyseliny, polysacharidy a lipopolysacharidy) a genotypové metody. Běžně užívanými fenotypovými rysy je bakteriální fermentace, tvorba konidií u hub, morfologie parazitů a cytopatický efekt u virů na buňky (Kúdela a kol., 2002).

Morfologická struktura mikroorganismů není dostatečně variabilní a nestačí na konečnou identifikaci. Pro podrobnější posouzení fenotypu je proto nutná kultivace, což je umělé pomnožení buněk (bakterií) na kultivačních půdách. Účelem kultivace je získání čisté kultury z vyšetřovaného vzorku pro další analýzy (Reischl, 2006; Votava, 2005).

Genotypové metody zjišťují přítomnost infekčního agens přímo v klinickém vzorku a bez potřeby kultivace, nejčastěji pomocí PCR. Dodatečná (podpůrná) analýza PCR produktu zvyšuje správnost identifikace a umožňuje charakterizaci patogena. Další důležité kroky zahrnují determinaci a odhalení genů nebo genových mutací odpovědných, např. za rezistenci k antimikrobiálním látkám. Automatizace a jednoduchý software činí molekulární technologie více dostupné, čímž byly posunuty hranice mikrobiální identifikace a charakterizace (Zaidi a kol., 2003; Tang a kol., 1998).

2.1.1 Fenotypové metody identifikace bakterií

V mikrobiologických laboratořích je stále hojně užívána kultivace, metoda pěstování kultury, kdy je zapotřebí nejméně 8 hodin inkubace, nejčastěji při 37 °C. Problémem při kultivaci může být pomalý růst buněk bakterií nebo požadavek na specifické podmínky. Ke kultivaci některých obtížně kultivovatelných mikroorganismů, což jsou hlavně intracelulární parazité (např. chlamydie, rickettsie a viry), je využíváno experimentálních zvířat, kuřecích embryí nebo tkáňových kultur.

Narostlá diagnostická kultura signalizuje přítomnost potenciálně infekčních mikroorganismů a poskytuje materiál pro fenotypovou analýzu (Tab. I), která je založena

na rozpoznání rozdílů v morfologii kolonií a buněk (tvar, profil, okraje, velikost, povrch, pigmentace, aroma, barvitelnost dle Grama, přítomnost a uspořádání bičíků), fyziologii (vztah ke kyslíku – aerobní x anaerobní, teplota, pH, tolerance k NaCl, využití zdrojů uhlíku/dusíku/síry), růstu, enzymatické aktivitě a dalších faktorech (inkluze, citlivost k antibiotikům, patogenita). Většina fenotypových vlastností je dána metabolismem živých a rostoucích buněk (Reischl, 2006; Votava, 2005).

Tab. I: Přehled fenotypových metod (Upraveno podle Reischl, 2006; O'Hara, 2005; Zaidi a kol., 2003)

	Metoda	Popis	Poznámky
Konvenční	mikroskopie	hodnotí se morfologie buněk (tvar, velikost, struktura buněčné stěny, přítomnost pouzder, endospor a inkluzí)	může být ztíženo tvarovou proměnlivostí bakteriálních buněk
	biotypizace a biochemické testy	založeno na metabolické aktivitě (biochemické reakce, fermentace cukrů, růst na selektivních médiích, citlivost vůči teplotě či pH)	omezená schopnost identifikace v rámci druhu
	serotypizace	rozlišení dle reakce bakteriálních antigenních determinantů a specifické protilátky	vhodné pro rozlišení kmenů
	citlivost vůči antibiotikům (mikrobiální rezistence)	testování vnímavosti/citlivosti vůči antibiotikům	omezená u nemocničních kmenů, (výskyt rezistence vyšší)
Molekulární	elektroforetická typizace proteinů	analýza proteinů na gelu, reakce s protilátkou na blotu	problém při srovnávání, otázka významu drobných rozdílů
	multilokusová enzymová elektroforéza	nedenaturační elektroforéza, sledování rozdílů na základě konformace	vhodné vybavení v málo laboratořích
	hmotnostní spektrometrie	chromatogram, profily mastných kyselin porovnány s databází	

Podle barvitelnosti dle Grama je možno bakterie rozdělit do dvou skupin na základě schopnosti či neschopnosti buněk udržet si Gramovo barvivo v prostředí ethanolu nebo acetonu, což souvisí se stavbou bakteriální buněčné stěny, která je u Gram-pozitivních bakterií složena převážně z peptidoglykanu a méně z lipidů, na rozdíl od Gram-negativních bakterií. Při barvení je užívána krystalová violet (tmavomodré zbarvení buněk), Lugolův roztok (tvorba komplexu barviva s jódem) a 96% ethanol nebo aceton. Některé bakterie jsou schopny barevný komplex barviva s jódem podržet – Gram-pozitivní (např. *Staphylococcus*, *Streptococcus*), jiné se rychle odbarví – Gram-negativní (např. *Escherichia*, *Pseudomonas*). Gram-negativní bakterie jsou pak dobarveny kontrastním barvivem (safranin, fuchsin) (Votava, 2005).

Biochemickými testy je prokazována přítomnost charakteristických buněčných složek (proteiny) a metabolitů (toxiny) mikroorganismů metodami instrumentální chemické analýzy. Testy jsou založené na reakci buněčných produktů bakterie a sacharidu, enzymu nebo proteinu (Ieven a kol., 2004). Při testech je dále zjišťováno využití zdrojů uhlíku mikrobem, proveden důkaz redukce dusičnanů (např. u rodu *Pseudomonas*), hydrolýzy škrobu a želatiny, je sledována tvorba indolu, sirovodíku (H₂S), acetonu a derivátů lysinu či ornithinu nebo je prováděn průkaz aktivity enzymů (např. katalasy, oxidasy, fosfatasy, ureasy, β-galaktosidasy) a další testy.

Techniky založené na využití zdrojů uhlíku (fermentaci) využívají přenosu elektronů z organické látky (zdroj uhlíku) na barvivo (tetrazolinová violet), které změní barvu. Tato technika umožňuje sledování oxidativních procesů během buněčného dýchání. Jiná technika je založena na růstu organismu v přítomnosti substrátu, což se projeví zakalením tekutého kultivačního média.

Pozitivní test založený na změně pH je indikován změnou barvy, pH se stává kyselější při využití karbohydrátů a alkaličtější při využití proteinů nebo vylučování dusíku. Tyto reakce jsou závislé na inkubační době, teplotě a inokulované látce (Reischl, 2006; Votava, 2005).

Konvenční fenotypové metody nadále zůstávají počátečním bodem ve vyšetřování vzorku a jsou doplňovány genotypovými metodami. Výhodou fenotypových technik je hlavně existence rozsáhlé databáze poznatků o vlastnostech jednotlivých bakterií, která vedla k vývoji poměrně spolehlivých komerčních souprav pro fenotypovou identifikaci bakterií. Přesto jsou pro správné použití těchto testů potřebné zkušenosti kvalifikovaného mikrobiologa. Hlavní nevýhodou je nutnost alespoň 16 h kultivace pro většinu testů. Komerční identifikační automaty jsou schopny u rychle rostoucích druhů bakterií tuto dobu zkrátit na 4 – 6 h, ale za cenu vyšších nákladů (Raclavský, ústní sdělení).

Tradiční fenotypové diagnostické metody mají známá omezení (možnost selhání v případě růstové náročnosti, výskyt rezistence) a z tohoto důvodu došlo během posledního

desetiletí k rozvoji molekulárně-genetických metod, které jsou charakterizovány menší časovou náročností (není nutná kultivace), vyšší citlivostí (detekce již 1 molekuly DNA) a specifičností (založena na detekci rodově-, druhově-, poddruhově-specifických sekvencí DNA či RNA, které jsou stálé v čase a nejsou ovlivněny environmentálními podmínkami). Metody jsou hodnoceny na základě limitu detekce, citlivosti, časové a finanční náročnosti a reprodukovatelnosti (Maiwald, 2004; Rompré a kol., 2002).

2.1.2 Molekulárně-genetické metody v lékařské mikrobiologii

Molekulárně-genetické metody zahrnují kromě genotypových metod, založených na studiu nukleové kyseliny, také techniky analyzující spektrum mastných kyselin a specifických proteinů, a proto jsou méně citlivé ke změnám životních podmínek. Podstatou molekulárně-genetických identifikačních metod je, že každá mikrobiální DNA obsahuje specifickou sekvenci nukleotidů, která je pro ni charakteristická. Možnosti aplikace se nacházejí ve čtyřech oblastech – detekce mikroorganismů, druhová identifikace, typizace a genotypizace. V mikrobiologii slouží ke dvěma hlavním účelům – (I.) průkazu přítomnosti mikroorganismu v klinickém vzorku a (II.) identifikaci izolovaného mikroba (Zaidi a kol., 2003; Belkum, 2003).

Molekulárně-genetické metody mohou nahradit kultivaci zejména u pomalu rostoucích druhů nebo u druhů, kde je kultivace obtížně proveditelná. Mohou být aplikovány na čisté kultury získané kultivací i přímo na primární vzorek od pacienta. Jejich dosavadní nevýhodou na rozdíl od již propracovaných konvenčních fenotypových technik je, že jsou teprve ve fázi vývoje. Využití těchto metod se nachází v epidemiologických studiích a detailnější analýze genotypu. Situace je rozdílná v různých částech světa podle výskytu oblastních (potenciálních) patogenů, kdy je přesná identifikace důležitá z hlediska epidemiologie, virulence a citlivosti k antibiotikům (Alfaresi a Elkosh, 2006).

Genotypové techniky jsou v prvním kroku založené buď na amplifikaci (PCR, NASBA, viz 2.1.3) nebo přímo na hybridizaci (FISH, viz 2.1.4.1) a lze jimi detekovat bakteriální rody, druhy až kmeny. Po amplifikaci nebo během ní je možno amplifikovanou sekvenci podrobněji analyzovat a to např. hybridizací se sondou nebo sekvencováním (Olive a Bean, 1999).

Pro genetickou analýzu je nejčastěji využívána ribozomální DNA (rDNA, tj. geny pro rRNA), např. 16S rDNA. Molekuly ribozomální RNA (rRNA) jsou důležité pro buněčný růst, funkce a přežití organismu a v důsledku toho je zmiňovaná oblast dostatečně sekvencně konzervativní pro návrh primerů amplifikujících DNA širokého spektra bakterií, ale zároveň také dostatečně variabilní v rámci určitých skupin bakterií, což je potřebné pro identifikaci.

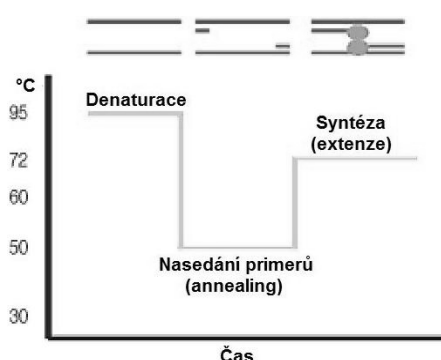
Oblast 16S rDNA genu obsahuje devět hypervariabilních oblastí označených V1 – V9, každá je lemovaná vysoce konzervativními sekvencemi. Druhově rozdílné sekvence uvnitř dané hypervariabilní oblasti představují vhodné cíle pro diagnostické testy (Chakravorty a kol., 2007; Amann a kol., 1997). Další využívanou oblastí je 23S rDNA gen a jiné evolučně konzervované geny (např. *hsp65*, *gyrB*) (Reischl, 2006).

2.1.3 Polymerasová řetězová reakce

Rozvoj molekulárně-biologických metod nastal se zavedením techniky PCR (*Polymerase chain reaction*, PCR) pro detekci nukleových kyselin. Základními důvody pro její rozvoj je rychlost, citlivost, reprodukovatelnost výsledků a redukce vnějších kontaminací (Kubista a kol., 2006; Mackay a kol., 2002). Ve stejném období se objevují technologie založené na značení fragmentů DNA radioaktivním fosforem a vizualizaci pomocí rentgenu. Časem se přidala kapilární a mikro-elektroforetická separace v kombinaci se sekvencováním (Reischl, 2006).

Pro provedení amplifikace musí PCR směs obsahovat pět základních složek – templátovou DNA, primery (oligonukleotidy o délce kolem 20 párů bází (bp), které jsou komplementární ke koncům amplifikovaného úseku), fluorescenční barvivo/DNA vázající fluorochromy (fluorescenčně značené sondy, inkorporující se fluorescenční barviva), termostabilní DNA-polymerasu a deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP).

Principem PCR (Obr. 1) je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA, ke které dochází po nasednutí dvou primerů, vážících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'OH-konce směřují proti sobě.



Obr. 1: Průběh jednoho cyklu PCR; tepelná denaturace (rozvolnění řetězců templátové dsDNA, 92 – 96 °C), hybridizace primerů („annealing“, nasednutí primerů na cílovou sekvenci, většinou 50 °C) a syntéza nového řetězce („extenze“, 72 – 78 °C, optimální teplota termostabilní DNA-polymerasy) (Upraveno podle Kubista a kol., 2006)

Amplifikované úseky (amplikony) jsou následně podrobeny detekci či následné analýze, např. gelovou elektroforézou, hybridizací se značenou sondou či sekvencováním (viz dále) (Kubista a kol., 2006; Mackay a kol., 2002).

Inhibice amplifikační reakce může být způsobena mnoha vlivy. Přítomnost inhibitorů je častá ve vzorcích z potravin, prostředí a klinického materiálu. Mechanismus inhibice spočívá v interferenci při lýzi buněk, jež je nezbytná pro extrakci DNA, degradaci a precipitaci nukleových kyselin nebo inhibici DNA-polymerasy (snížení citlivosti PCR až zablokování reakce). Inhibitory lze rozdělit do dvou skupin – (I.) endogenní, které jsou obsaženy přímo ve zpracovávaném vzorku, používaných enzymech nebo materiálu (hem, hemoglobin, imunoglobulin G, kolagen, melanin, myoglobin) a (II.) exogenní, pocházející z okolního prostředí/reagencií (bakterie, prach) (Akane a kol., 1994).

Technika PCR je vhodná pro amplifikaci molekul DNA, diagnostiku infekčních případně genetických (např. mutací genů) a virových onemocnění v jejich počátku, kdy je titr viru nízký, a detekci antimikrobiální rezistence (detekce genů rezistence) a mikrobiologickou diagnostiku (Louie a kol., 2000).

Byla vyvinuta řada modifikací PCR (např. multiplex, nested, reverzní, kvantitativní a broad-range), které jsou nastíněny v následujících řádcích.

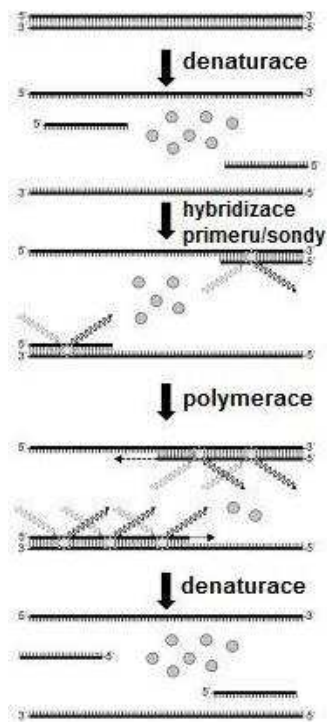
Při multiplex PCR je využíváno více párů primerů současně, které se vyznačují podobnou teplotou tání, což umožňuje paralelní identifikaci více genových úseků jednoho mikroorganismu (např. genů virulence) nebo identifikaci více mikroorganismů.

Nested („uhnížděná“) PCR je užívána k citlivé a specifické detekci velmi malého počtu kopií cílové DNA ve vzorku. Technika je charakterizována dvoukrokovým systémem, zahrnujícím dvě po sobě jdoucí amplifikace s využitím více párů primerů, s cílem zisku dostatečného množství DNA fragmentů. Oba použité páry primerů při nested PCR musí specificky reagovat v očekávané oblasti a mít odlišný bod tání. Jeden pár primerů slouží k amplifikaci širšího cílového úseku molekuly DNA při první reakci. Druhý pár nasedá při druhé reakci, tzv. nested reakci, v rámci produktu první reakce. Hlavní nevýhodou nested PCR je kontaminace negativních vzorků produkty předchozí amplifikace.

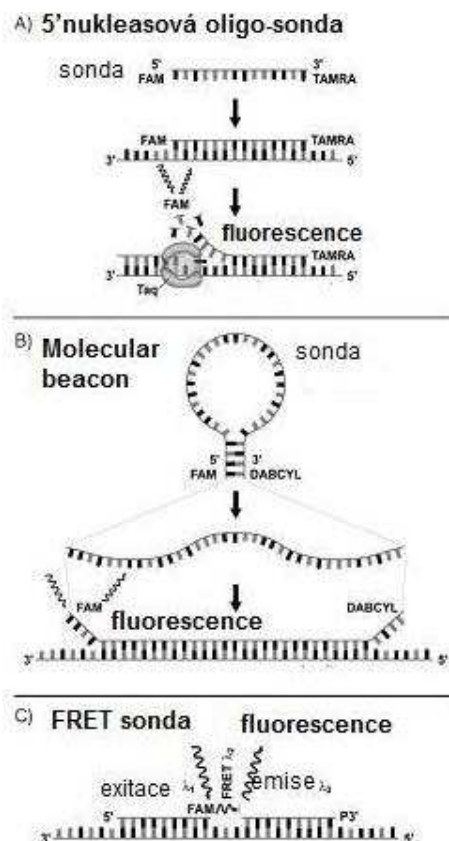
Reverzní PCR (RT-PCR) je určena k amplifikaci molekul RNA (včetně mRNA a rRNA). RNA je nejdříve přepsána pomocí reverzní transkriptasy do komplementární DNA (cDNA) a následně amplifikována. Komplementární DNA je většinou přepsanou mRNA, a proto neobsahuje na rozdíl od genomické DNA introny (Trtková a Raclavský, 2006).

Kvantitativní (real-time) PCR (qPCR) umožňuje průběžné sledování tvorby PCR produktů a jejich kvantifikaci. Existují dvě možnosti detekce – nepřímá (nespecifická) a přímá (cílově-specifická). Při nespecifické detekci jsou využívána inkorporující se fluorescenční barviva (např. SYBR Green) (Obr. 2) a specifické fluorescenčně značené sondy s různým uspořádáním (Obr. 3 A-C) – 5'nukleosová oligo-sonda (TaqMan), vlásenkové sondy

(Molecular beacon) a FRET sondy (*Fluorescence resonance energy transfer*) (Epsy a kol., 2006; Mackay a kol., 2002). Získaná data mohou být využita k monitorování počtu kopií cílové DNA (Trtková a Raclavský, 2006; Bustin, 2000).



Obr. 2: Inkorporující se barvivo (Upraveno podle Bustin, 2000)



Obr. 3 A-C: Fluorescenčně značené sondy (Upraveno podle Epsy a kol., 2006)

Broad-range PCR z hlediska klinické účelnosti může detekovat a následně identifikovat široké spektrum organismů na základě unikátních sekvencí DNA (např. geny pro rRNA, které je možné nalézt v rámci všech tří domén – *Bacteria*, *Archaea* i *Eucarya*). Často je realizována ve formě real-time PCR. Při použití pro přímou detekci je zde vyšší riziko falešně pozitivních nebo negativních výsledků, např. vlivem inhibitorů obsažených ve tkáních nebo krvi (erytrocyty – možnost hemolýzy) (Cheng a kol., 2006; Maiwald, 2004).

Broad-range PCR má dvě hlavní výhody – (I.) postrádá selektivitu vůči specifické skupině bakterií a (II.) je schopna detekovat a identifikovat rezistentní, náročné nebo pomalu rostoucí druhy. Nevýhodou je nedosahování stejného stupně citlivosti jako techniky PCR specifické pro jednotlivé mikroorganismy.

Po proběhnutí PCR reakce většinou následuje post-PCR analýza, např. agarosová elektroforéza, hybridizace se sondami, restrikční analýza, sekvencování nebo nově komerčně dostupná analýza tání (viz 2.1.4.3).

Nejjednodušší, ale současně málo citlivou metodou, je elektroforéza v agarosovém gelu. Principem této metody je obarvení amplikonů rozdělených podle své relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje fluorescenčním barvivem. Nejčastěji se používá ethidium bromid, který se interkaluje mezi nukleotidy. K vizualizaci obarvených amplikonů dochází pomocí UV transluminátoru. Některé elektroforetické techniky, jako např. gelová elektroforéza v denaturačním gradientu a polymorfní analýza na základě konformace jednořetězcové DNA (ssDNA), mohou rozlišovat bakteriální druhy na základě rozdílné mobility molekul s různou sekvencí.

Vysokou citlivostí (20 – 100-krát vyšší než agarosové elektroforézy) a specifitostí se vyznačují metody s použitím hybridizačních sond (Southern blot kombinovaný s hybridizací nebo DNA microarraye) a sekvencování. Southern blot spočívá v přenosu a následné imobilizaci amplikonů na membráně, kde jsou podrobeny hybridizaci se specifickou sondou (Maiwald, 2004).

Jiné uspořádání amplifikační techniky lze najít u náhodné amplifikace polymorfní DNA (RAPD, AP-PCR), NASBA, LCR a Q β replikační reakce (Trtková a Raclavský, 2006; Olive a Bean, 1999; <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>).

RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) vychází z klasické metody PCR, ale na rozdíl od ní využívá pouze jeden krátký primer o velikosti 9 – 10 bp s náhodnou sekvencí, který hybridizuje s DNA matricí za nízké teploty. Vzhledem k použití nespecifických primerů není nutné znát templátovou sekvenci. Amplikony o neznámé sekvenci, které vznikají v případě, že RAPD primery nasedají na protilehlé řetězce DNA proti sobě a ve vzájemné vzdálenosti do několika málo kbp, jsou separovány gelovou elektroforézou a obarveny ethidium bromidem (Olive a Bean, 1999).

NASBA (*Nucleic acid sequence based amplification*) je specifickou a citlivou technikou pro amplifikaci RNA, která využívá během svého průběhu tři enzymů (reverzní transkriptasa, ribonukleasa H a T7 RNA-polymerasa). Označené oligonukleotidové sondy (primery) hybridizují se specifickou sekvencí DNA. Při porovnání s PCR je výhodou, že není potřeba teplotního cyklování. Naopak problémem je rychlá degradace RNA a vyšší cena, hlavně díky používaným enzymům (Trtková a Raclavský, 2006).

Ligační řetězová reakce (*Ligase chain reaction*, LCR) je metoda amplifikace DNA pro detekci stopových množství DNA o známé sekvenci. Jedná se o dvoufázovou cyklickou reakci. Během první fáze se za zvýšené teploty (95 °C) rozvinou dsDNA na ssDNA a v druhé (70 °C) jsou hybridizovány dvě sady komplementárních oligonukleotidů k cílovým molekulám a jsou spojeny termostabilní ligasou (*Tth* nebo *Pfu*).

Q β replikační reakce je založena na schopnosti RNA bakteriofága Q β využívat enzym RNA-polymerasu (nepotřebuje oligonukleotidový primer pro iniciaci syntézy RNA, ale je schopen rozpoznat specifickou sekvenci RNA – iniciátor) k replikaci svého genomu. K další reakci není zapotřebí denaturace (<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>).

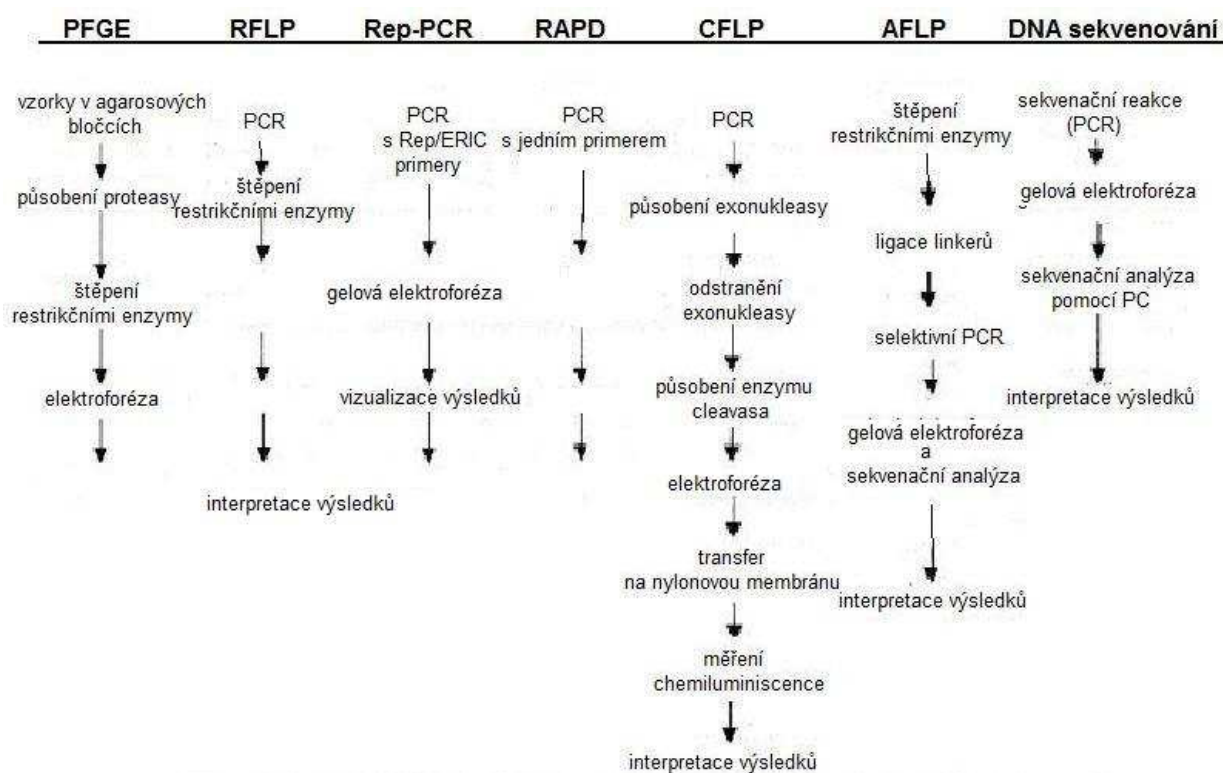
2.1.4 Genotypové metody v klinických laboratořích

Genotypová identifikace se objevuje jako alternativa nebo doplněk k tradičním fenotypovým metodám. Většinou genotypových metod zpravidla předchází PCR (Tang a kol., 1998). V následující podkapitole je srovnáno několik nejběžnějších genotypových metod (Tab. II, Schéma 1), které jsou v dnešní době používány v klinických laboratořích (Olive a Bean, 1999).

Tab. II: Souhrnný přehled genotypových metod (Převzato z Olive a Bean, 1999)

Založeno na	Metoda	
PCR	využívá se restrikčních nukleas	PFGE (<i>Pulsed-field gel electroforesis</i>)
		RFLP (<i>Restriction fragment length polymorfism</i>)
		CFLP (<i>Cleavase fragment length polymorfism</i>)
		AFLP (<i>Amplified fragment length polymorfism</i>)
		RAPD (AP-PCR) (<i>Random amplified polymorphic DNA</i>)
		Rep-PCR (<i>Repetitive extragenic palindromic-PCR</i>)
		ERIC (<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>)
		BOX sekvence
		sekvencování
		analýza tání s vysokým rozlišením (<i>High resolution melting analysis, HRMA</i>)
PCR + hybridizaci	Southern blot	
hybridizaci	FISH (<i>Fluorescence in situ hybridization</i>)	

Schéma 1: Postupy základních genotypových metod (Upraveno podle Olive a Bean, 1999)



2.1.4.1 Genotypové metody pro identifikaci mikrorganismů

K vyhledání specifických sekvencí lze použít, kromě techniky PCR (viz 2.1.3), i metody hybridizační. Jejich principem je schopnost hybridizace dvou navzájem komplementárních jednořetězcových DNA (ssDNA) či RNA molekul. Příkladem může být metoda fluorescenční in situ hybridizace (*Fluorescence in situ hybridization*, FISH).

Principem FISH je hybridizace fluorescenčně značené DNA sondy se specifickým úsekem DNA nebo RNA. Tato metoda umožňuje detekovat specifické genové sekvence v cytologických preparátech, biofilmech, sedimentech, kalech a vzorcích vod. Hybridizované sondy se zviditelní pomocí fluorescenčního mikroskopu. V mikrobiologii je tato metoda využitelná jen pro druhovou identifikaci, nikoli pro typizaci (Trtková a Raclavský, 2006; Rompré a kol., 2003).

Použití sond pro detekci a identifikaci bakterií v klasickém uspořádání (např. Southern blot) příp. v podobě DNA-microarray je vysoce specifické. Nevýhodou může v některých případech být nedostatečná schopnost rozlišení blízkce příbuzných druhů patogenů. Důvodem je vysoká sekvenční homologie v rámci vybraných hypervariabilních oblastí. Citlivost může být zvýšena použitím citlivějších sond (např. sonda s křenovou peroxidasou, na kterou se pro zesílení signálu post-hybridizačně naváže tyramid značený fluorochromem) nebo vícečetným fluorescenčním značením (Amann a kol., 1997).

2.1.4.2 Genotypové metody pro typizaci mikroorganismů

V rámci epidemiologických a fylogenetických studií je mnohdy důležitá detekce až na jednotlivé kmeny. Rozlišení kmenů zároveň obvykle umožňuje druhovou identifikaci. Nejčastěji používanými technikami jsou PFGE, RAPD, AFLP, RFLP, fingerprinting plastidů, sekvencování (multilokusová sekvenční typizace, MLST) a HRMA (viz 2.1.4.3) (Belkum, 2002; Olive a Bean, 1999).

Pulzní gelová elektroforéza (PFGE) chromosomální DNA je často považována za standard v rámci genotypových metod typizace bakterií. Bakteriální izolát je společně s agarosou a lyzačním pufrům nalit do malých formiček. Výsledkem jsou malé agarosové zátky s lyzovanými bakteriálními buňkami, které jsou následně vystaveny restričním enzymům. DNA různých druhů je naštípána různě a díky tomu je možné následně provést identifikaci až typizaci pomocí PFGE, kdy je v předem určených intervalech průběžně měněna polarita proudu. Pulzní pole umožní separaci velkých fragmentů molekul DNA (10 – 800 kb). Tato metoda umožňuje zavedení širokých databází pro analýzu a typizaci bakterií.

Další metodou využívající restriční enzymy je RFLP, která spočívá ve štěpení molekul DNA na fragmenty ve specifických místech, tzv. restričních místech, restričními endonukleasami. Na rozdíl od PFGE jsou používány často štěpící enzymy, takže vzniká velké množství menších fragmentů. Po štěpení jsou fragmenty DNA separovány na gelu a zejména pokud je restriční profil nepřehledný, je možné provést Southern blot, kdy jsou fragmenty pomocí kapilární síly přeneseny z gelu na nitrocelulosovou nebo nylonovou membránu. Na membránu je následně nanášena specifická značená sonda detekující variabilní fragmenty, která reaguje s DNA na základě homologie. Nejčastěji je používána část rDNA operonu, která zviditelní variabilní fragmenty obsahující geny pro rRNA. Tento postup je označován jako ribotypizace.

Metoda CFLP (*Cleavase fragment length polymorphism*) využívá enzymu cleavasa I, což je termostabilní endonukleasa sestávající z 5`nukleotidové domény (1 – 281 aminokyselin) z DNA-polymerasy z bakterie *Thermus aquaticus*. Zatímco obyčejné endonukleasy rozpoznávají specifické DNA sekvence, cleavasa I rozpoznává struktury vzniklé při zvýšených teplotách, kdy po tepelné denaturaci (cca 95 °C) následuje zchlazení (50 – 60 °C). Tímto procesem vznikají smyčky, které jsou pro jednotlivé druhy specifické a jsou rozpoznávány cleavasou I. Metoda je omezena velikostí fragmentů, se kterými se pracuje, a je zatím ve fázi vývoje. Fragmenty o velikosti větší než 1 kbp nelze elektroforeticky spolehlivě separovat (Olive a Bean, 1999).

Technika AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) je používána pro identifikaci a typizaci. V rámci techniky jsou užívány dva různé restriční enzymy (např. *EcoRI* a *MseI*). K vzniklým fragmentům jsou připojeny linkery, je provedena selektivní PCR a následně

analýza PCR produktů. Nevýhodou je nepraktičnost radioaktivního značení pro klinické použití, které je možné nahradit fluorescenčním značením (Dijkshoorn a kol., 1996).

Metoda RAPD (*Random amplification polymorphism DNA*) je založena na amplifikaci fragmentů pomocí jednoho primeru náhodné sekvence (typicky 10 bp), který díky nevyhraněným podmínkám (nízká teplota) a krátké sekvenci hybridizuje s chromosomální DNA na mnoha místech. Umístění fragmentů na chromosomu se pro jednotlivé bakteriální druhy liší (Trtková a Raclavský, 2006; Olive a Bean, 1999).

Rep (*Repetitive extragenic palindromic*) sekvence a ERIC (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*) sekvence byly popsány pro použití při PCR fingerprintingu bakteriálních genomů. Rep elementy jsou sekvence o 38 bp se 6 degenerovanými pozicemi a variabilní smyčkou o 5 bp mezi konci palindromické sekvence. ERIC sekvence jsou elementy o 126 bp, které obsahují vysoce konzervativní centrálně obrácené repetice. Jako první byly detekovány u *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*. Rep a ERIC sekvence jsou lokalizovány v extragenových regionech a jsou běžně užívanými oblastmi pro typizaci s využitím PCR. Další možností je BOX sekvence pro typizaci *Streptococcus pneumoniae*. BOX sekvence jsou lokalizovány v intergenových regionech a díky souměrnosti jsou také schopny vytvářet smyčky. Jsou složeny ze tří podjednotek – boxA, boxB a boxC a přísluší jim délky 59, 45 a 50 bp (Olive a Bean, 1999).

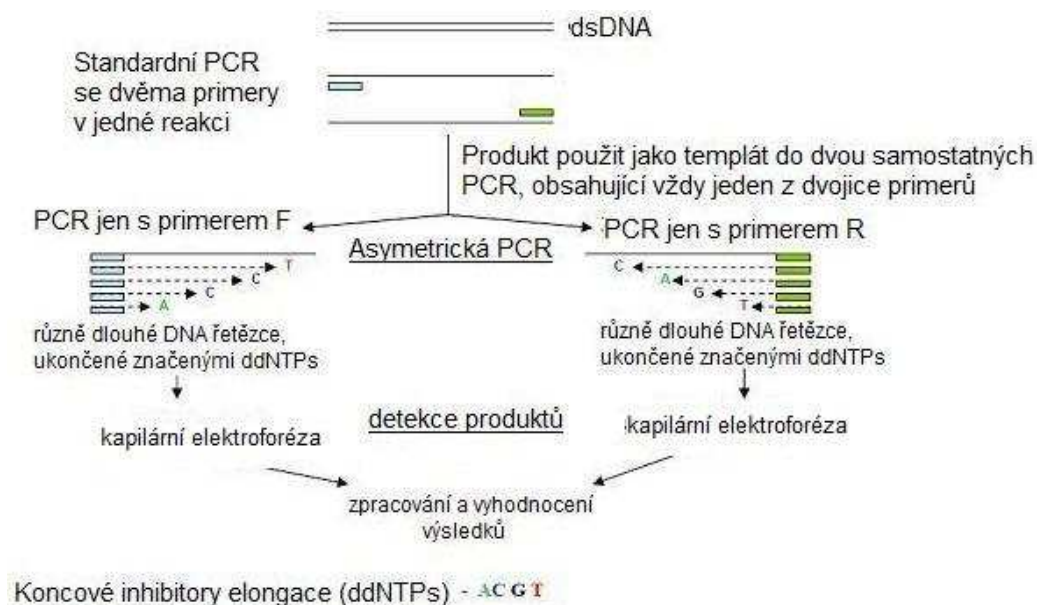
Pro analýzu příbuznosti kmenů je nejlepší metodou multilokusová sekvenční typizace (*Multilocus sequence typization*, MLST), ve které jsou pro konkrétní bakteriální druh určovány sekvence několika vybraných „housekeeping genů“. Kombinace jejich bodových sekvenčních polymorfismů pak jednoznačně určí příslušnost určitého izolátu ke konkrétnímu kmenu. Výhodou techniky je nezpochybnitelnost a spolehlivost dat, která jsou dokonale mezilaboratorně srovnatelná a umožňují globální epidemiologické studie. Nevýhodou jsou vysoké náklady, pracnost a nutnost vytypovat nejdříve pro každý bakteriální druh vhodné geny a ověřit zda je variabilita jejich alel dostatečná pro typizaci.

Genotypové metody mají společnou schopnost rozlišení nižších taxonomických skupin na základě rozdílů v sekvenci DNA. Nejspolehlivějším a nejlépe rozlišujícím postupem je proto sekvencování vhodných oblastí. Při sekvencování bylo původně používáno pro vizualizaci reakčních produktů radioaktivní značení, které není zcela vhodné pro rutinní klinické použití. Nově je používáno fluorescenční značení a sekvence je čtena pomocí automatického sekvenátoru. V principu jde o asymetrickou PCR zaměřenou na specifickou oblast, následně se pokračuje přečištěním, sekvenační reakcí a kapilární elektroforézou v polyakrylamidovém gelu.

Dnešní sekvenátory fungují na základě dideoxy metody (Sangerova metoda, Schéma 2), kdy vložení dideoxynukleotidu (ddNTP) zakončí prodlužování řetězce. Každý ddNTP je označen jinou fluorescenční barvou. V jedné reakci tak vznikají různě dlouhé fragmenty

zakončené vždy přidaným terminátorem (ddNTP). Délka fragmentů je následně stanovena pomocí elektroforetické separace a sekvence DNA je určena z kombinace výsledků 4 reakcí do nichž byl přidán vždy jeden typ ddNTP. Získané výsledky jsou zpracovány pomocí specializovaného softwaru (<http://www.pr-lab.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf>).

Schéma 2: Sangerova metoda sekvencování (Upraveno podle <http://www.pr-lab.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf>)



Méně nákladnou a pro účely mikrobiologické identifikace a typizace dostačující technikou je pyrosequencování, jedna z technik sekvencování nové generace.

Znamé sekvence DNA různých organismů je možné nalézt v databázích (např. NCBI), které je možné využít i při analýze sekvence. Na identifikaci studované sekvence je možné navázat fylogenetickou analýzou (Maiwald, 2004).

Tang a kol. (1998) se zabývali srovnáním přesnosti identifikace pomocí fenotypových metod (Biolog, založeno na biochemických reakcích; chromatografický systém MIDI a Sherlock, hodnotící profily mastných kyselin) a genotypových metod založených na PCR a následné post-PCR analýze (Microseq, založeno na sekvencování). Jako referenční systém byla zvolena konvenční Mayova metoda (založeno na biochemických testech). Srovnání bylo provedeno na 72 klinických izolátech Gram-negativních tyčinek (Příloha 10.1). Studované fenotypizační systémy dosahovaly úspěšnosti cca 50 – 60 % a genotypizační 80 – 100 %.

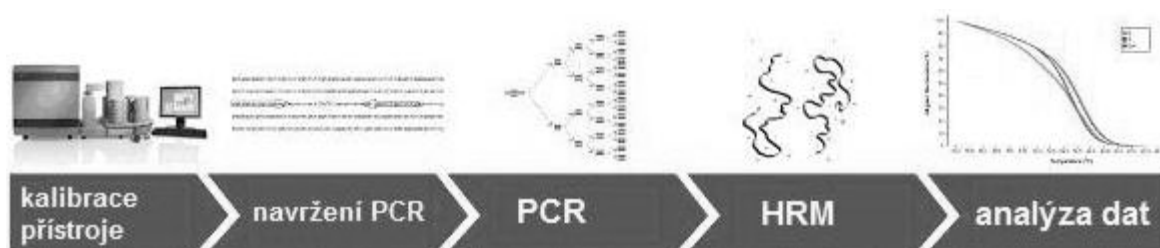
2.1.4.3 Analýza tání s vysokým rozlišením

V posledních několika letech je komerčně k dispozici ekonomicky zajímavá, rychlá, citlivá a specifická post-PCR technika, analýza tání dsDNA, respektive její technologicky vylepšená varianta – analýza tání s vysokým rozlišením (*High resolution melting analysis*, HRMA). Analýza tání zpravidla následuje po PCR, zahrnující v reakční směsi interkalující se fluorescenční barvivo (např. LCGreen, SYBR Green) (Vossen a kol., 2009; Wittwer, 2009; deSilva a Blackett, 2007).

Technika je založena na faktech popsanych již Watsonem a Crickem – ve struktuře DNA jsou v závislosti na její sekvenci různě zastoupeny páry bází adenin a thymin (A=T) a cytosin a guanin (C≡G) (Vossen a kol., 2009; Reischl, 2006).

Analýza tání (Schéma 3) potřebuje pro správný průběh 3 základní nástroje: (I.) PCR reagentie a netoxické, s PCR neinterferující, saturační, interkalující se fluorescenční barvivo; (II.) vhodnou instrumentaci a (III.) software pro HRMA (Patel, 2009).

Schéma 3: Analýza tání s vysokým rozlišením (Upraveno podle http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_070383.pdf)



Pozn.: HRM – *High Resolution melting*

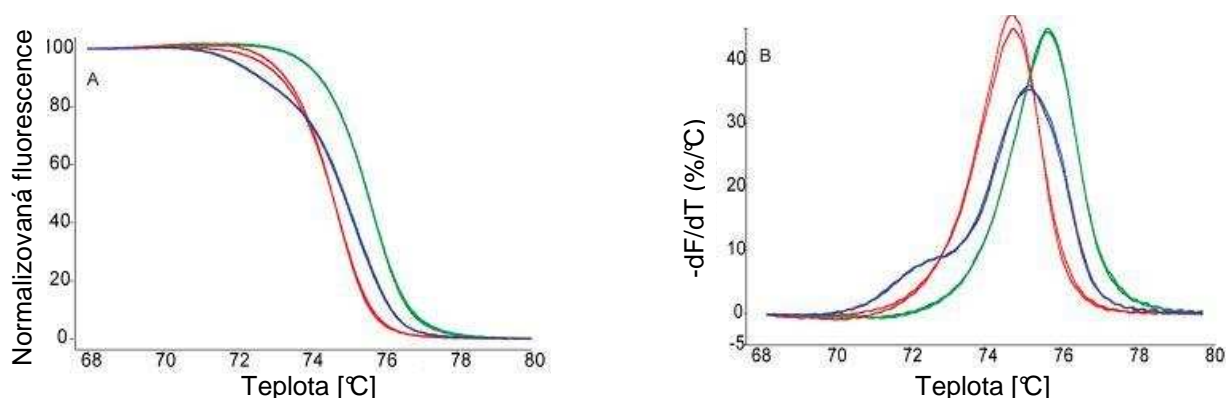
PCR produkt je podroben analýze tání, která je založena na monitorování vyzařované fluorescence při teplotách rostoucích obvykle v rozmezí 55/60 – 95 °C. Při denaturaci dsDNA, v průběhu vzestupu teploty, dochází k uvolňování inkorporovaného barviva a tím k poklesu fluorescence, který je úměrný míře denaturace (Vossen a kol., 2009; deSilva a Blackett, 2007; Montgomery a kol., 2007). K rozvolnění tří vodíkových můstků mezi cytosinem a guaninem (C≡G) je zapotřebí větší energie než k rozvolnění dvou mezi adeninem a thyminem (A=T). Průběh tání konkrétní molekuly DNA tedy závisí na její délce a sekvenci. Proces denaturace je charakterizován tzv. teplotou tání (T_M), která je definována jako teplota, kdy je právě 50 % přítomných molekul dsDNA ve formě ssDNA.

Křivka tání přechází z pre-melt fáze (dsDNA), kdy je fluorescence vysoká (blízká 100 %) do post-melt fáze (ssDNA), kdy je fluorescence nízká až nulová. Střed křivky tání je

charakterizován jako melting doména. V této oblasti, kde je rychlost změny fluorescence největší, je definována teplota tání (T_M). Hodnota T_M je závislá na typu a sledu komplementárních párů bází. Úseky DNA s větším obsahem A=T jsou méně odolné vůči UV záření a denaturují při nižších teplotách (Vossen a kol., 2009; Reischl, 2006).

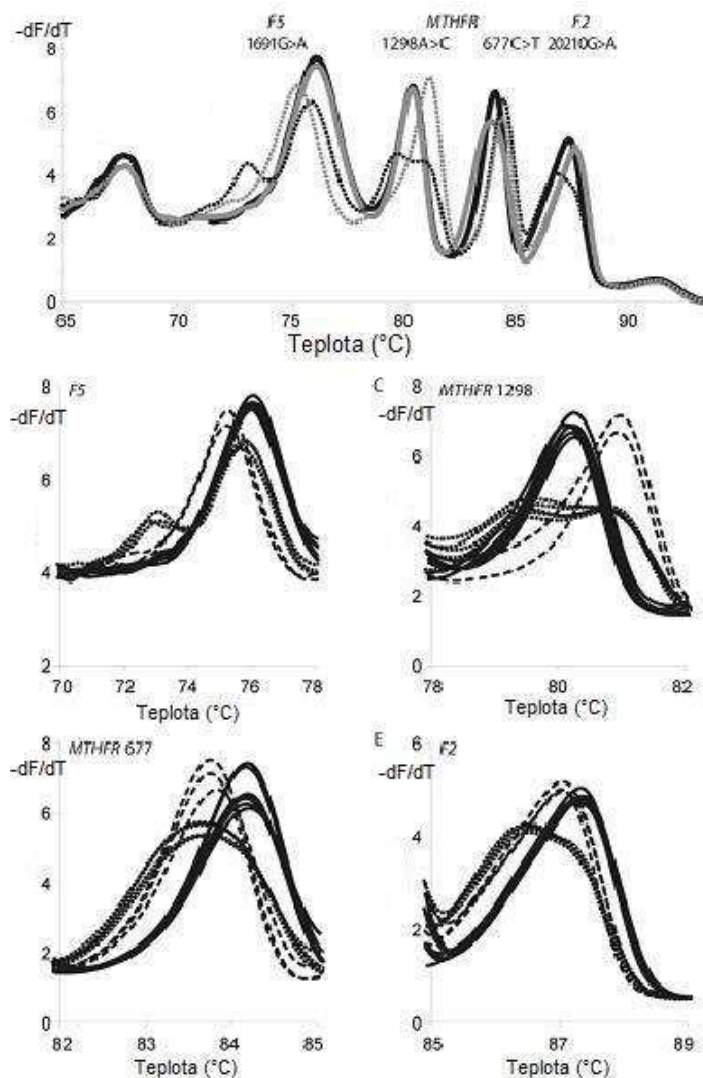
Na stabilitu DNA může mít vliv i methylace cytosinu, hlavně v oblastech dinukleotidu CpG. Jedná se o epigenetickou regulaci, např. transkripce a umlčování endogenních genů. Methylace DNA může být spjata s buněčným cyklem, různými chorobnými stavy, včetně dědičných poruch nebo některých forem rakoviny. Problémem při amplifikaci (methylačně-specifická PCR, MSP) je, že během replikace je methyl-cytosin nahrazen cytosinem. Řešením je ošetření DNA (vzorku) hydrogensířičitanem sodným, následkem čehož dojde k přeměně cytosinu (C) na uracil (U). Methylovaný cytosin je proti této přeměně chráněn. Po podrobení takto získaných amplikonů analýze tání, je možné po porovnání křivek tání, usuzovat na četnost výskytu methyl-cytosinu. Methylovaná DNA bude mít větší obsah C≡G a tedy i vyšší T_M . Výsledkem je methylační profil (Kristensen a kol., 2008; Dahl a Guldborg, 2007).

Získaná data jsou zpracována pomocí počítačového programu, v prvním kroku tzv. normalizací, kdy jsou relativní intenzity fluorescence jednotlivých křivek tání přepočítány na stejnou výchozí a konečnou hodnotu tak, aby bylo možno křivky vzájemně porovnat. Porovnáním získaných normalizovaných křivek tání (profilů tání, Graf 1A) nebo srovnáním poloh píků v derivovaných křivkách (Graf 1B), získaných matematicky jako záporná derivace fluorescence s teplotou v každém měřeném bodě ($-dF/dT$), je možné provést identifikaci amplifikovaných molekul DNA. S přístroji v provedení s vysokým rozlišením je dosahováno přesnosti až desetin $^{\circ}\text{C}$ (Wittwer a kol., 2009; Erali a kol., 2008).



Graf 1: Křivka tání; (A) normalizované křivky tání, (B) derivované křivky (Upraveno podle Erali a kol., 2008)

Analýza tání může být i v multiplex uspořádání (Obr. 4), kdy je použito více než jedné sondy, případně více párů primerů v rámci PCR směsi. Každá sonda musí být označena fluorochromem odlišné barvy (Lyon a Wittwer, 2009; Erali a kol., 2008).



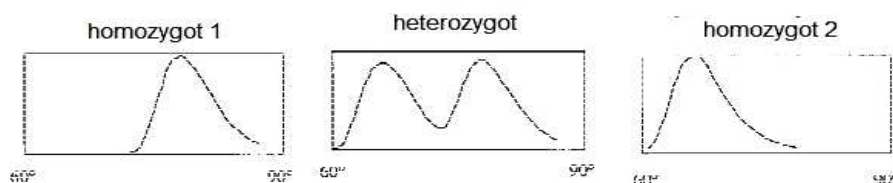
Obr. 4: Derivované křivky při multiplex uspořádání, studie thrombofilie (Upraveno podle Erali a kol., 2008)

Pokud je provedena identifikace PCR produktu pomocí analýzy křivky tání, není nutná vizualizace dělením v agarosovém gelu, protože podle T_M je možno usuzovat na relativní velikost fragmentu DNA a obsah C≡G (Alfaresi a Elkosh, 2006).

Analýza tání je jednoduchou, rychlou a levnou technikou, ale má i několik limitujících faktorů. Správný průběh závisí na dobře provedené PCR, instrumentaci a vhodném barvivu. Fluorescenční barvivo se může navázat na jinou než zkoumanou molekulu dsDNA (např. templátové dimery, primery). Pro správnou detekci zkoumaných produktů je tedy důležitá

specifita PCR. Nespecifické produkty mohou ovlivnit výsledek analýzy tání. Všechny složky PCR směsi, jejich koncentrace a změny teploty mají vliv na absolutní pozici a šířku píku. Detekce inzercí a delecí je obtížnější než detekce substitucí. Nejvhodnější délkou sekvence je 400 bp (Wittwer, 2009; Herrman a kol., 2006).

Homozygotní seskupení alel se vyznačuje teplotním posunem, zatímco heterozygot změnou tvaru křivky tání (Obr. 5), která je zapříčiněna destabilizací heteroduplexu mezi standardním genotypem a jinou variantou. Křivka tání heterozygota je složená z komponent křivek heteroduplexu a homoduplexu, protože je tento heteroduplex rychleji rozdělen, dojde k posunu píku (deSilva a Blackett, 2007).



Obr. 5: Rozlišení křivek heterozygota a obou možných homozygotních variant (Upraveno podle Germer a Higuchi, 1999)

2.1.4.4 Využití analýzy tání

Z uvedených poznatků a studií vyplývá, že technika analýzy tání s vysokým rozlišením je v principu použitelná pro detekci a identifikaci klinicky významných druhů bakterií, kvasinek a virů a dále pro genotypizaci až haplotypizaci a detekci mutací či SNPs. Pro celkový přehled a srovnání jsou možnosti analýzy tání v lékařské mikrobiologii uvedené v tabulce III.

Tab. III: Souhrnná tabulka příkladů využití analýzy tání v lékařské mikrobiologii

	Techniky	Cílová oblast	Účel	Citace
Identifikace a typizace bakterií	<ul style="list-style-type: none"> • real-time PCR • hybridizace se sondou (Molecular Beacon) • analýza tání (HRMA) 	regiony V3 a V6 16S rRNA genu	identifikace bakteriálních patogenů z klinického materiálu	Chakravorty a kol. (2010)

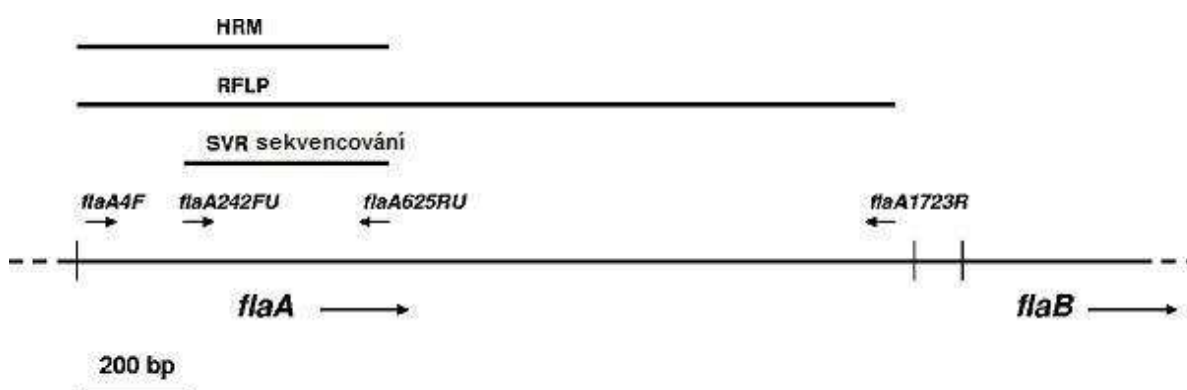
Tab. III: Souhrnná tabulka příkladů využití analýzy tání v lékařské mikrobiologii – pokračování

	Techniky	Cílová oblast	Účel	Citace
Identifikace a typizace bakterií	<ul style="list-style-type: none"> • PCR-HRMA • RFLP, sekvencování 	gen kódující flagelin (<i>flaA</i>)	genotypizace <i>Campylobacter jejuni</i> a <i>C. coli</i>	Merchant-Patel a kol. (2010)
	<ul style="list-style-type: none"> • 3 paralelní real-time PCR • analýza tání (HRMA) 	regiony V1, V3 a V6 16S rRNA genu	jednoduchá a rychlá identifikace s vysokou specifitou	Yang a kol. (2009)
	<ul style="list-style-type: none"> • real-time PCR • sekvenační analýza 	V1 – V9 16S rDNA genu	identifikace bakterií	Chakravorty a kol. (2007)
	<ul style="list-style-type: none"> • broad-range PCR • analýza tání (HRMA) 	16S rDNA gen	identifikace klinicky významných bakterií	Cheng a kol. (2006)
	<ul style="list-style-type: none"> • real-time PCR • analýza tání (HRMA) 	16S rDNA gen	identifikace v rámci rodu <i>Staphylococcus</i>	Skow a kol. (2005)
	<ul style="list-style-type: none"> • hybridizace se sondou • real-time PCR • analýza tání (HRMA) 	16S rDNA gen	identifikace bakterií	Klaschik a kol. (2004)
Identifikace a typizace kvasinek	<ul style="list-style-type: none"> • PCR • mikrosatelitový délkový polymorfismus (MLP) • analýza tání (HRMA) 	CDC3 lokus	genotypizace <i>Candida albicans</i>	Costa a kol. (2010)
	<ul style="list-style-type: none"> • PCR • McRAPD 	oblast amplifikovaná pomocí primeru ACG GGC CAG T	identifikace 9-ti druhů kvasinek	Trtková a kol. (2009) Plachý a kol. (2005)
	<ul style="list-style-type: none"> • PCR • analýza tání (HRMA) • sekvenační analýza 	oblasti ITS-1 a 2 rDNA genu	patogenní kvasinky rodu <i>Candida</i> a <i>Cryptococcus</i> spp.	Bergman a kol. (2007)
Identifikace virů	<ul style="list-style-type: none"> • hybridizace se sondou • real-time PCR • HRMA 	neuveдено	detekce a identifikace HSV-1 a HSV-2	Epsy a kol. (2006)

Chakravorty a kol. (2010) vyvíjeli postup identifikace bakteriálních patogenů vyskytujících se v klinických vzorcích. Vyvinuli metodu spojující real-time PCR s následnou analýzou tání a hybridizací s několika sondami typu Molecular Beacon (Příloha 10.2). Kombinací hodnot T_M vygenerovaných pomocí několika sond bylo dosaženo identifikace. Metoda byla testována na 270 bakteriálních kulturách (Příloha 10.3). Každému druhu byla přiřazena D hodnota, která byla vypočítána jako vzdálenost mezi T_M stanovenou pro jednotlivé druhy a získanou hodnotou. D hodnota větší než 5 byla považována za neurčitou. Specifita metody byla 100 %.

Merchant-Patel a kol. (2010) vyvinuli metodu pro genotypizaci *Campylobacter jejuni* (87) a *C. coli* (15) zaměřenou na gen *flaA* (Schéma 4) pomocí PCR s následnou analýzou tání. Výsledky získané pomocí analýzy tání byly podpořeny RFLP a SVR sekvencováním.

Schéma 4: Gen *flaA* se znázorněním primerů a úseků užívaných pro HRM, RFLP a SVR sekvencování (Upraveno podle Merchant-Patel a kol., 2010)



Pozn.: HRM – *High resolution melting*, analýza tání s vysokým rozlišením

RFLP – *Restricted-field length polymorphism*, délkový polymorfismus restrikčních fragmentů

SVR sekvencování – sekvencování krátkých hypervariabilních regionů (SVR)

flaA – gen kódující flagelin A

Yang a kol. (2009) testovali metodu analýzy tání s vysokým rozlišením na 100 běžných klinických druzích (58 bakteriálních druhů pocházelo z Americké sbírky typových kultur – ATTC, klinické izoláty a inaktivní/nepatogenní kmeny) (Příloha 10.4).

Z každého kmene bylo vyzolováno a extrahováno 10 – 15 vzorků. Vzorky byly podrobeny třem paralelním real-time PCR reakcím, kdy PCR směs obsahovala vždy 1 z párů primerů – V1f (5'-GYG GCG NAC GGG TGA GTA A-3') a V1r (5'-TTA CCC CAC CAA CTA GC-3'), V3 (5'-CCA GAC TCC TAC GGG AGG CAG-3') a V3r (5'-CGT ATT ACC GCG GCT

GCT G-3') a V6f (5'-TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A-3') a V6r (5'-AGC TGA CGA CAN CCA TGC A-3'). Každý amplikon byl následně podroben analýze tání s vysokým rozlišením (HRMA) v rozmezí teplot 60 – 95 °C a po normalizaci a derivaci profilů tání byly získané výsledky vyhodnocovány. Jako referenční vzorek byl brán profil *Staphylococcus aureus*. Příbuzné druhy vykazovaly jistou podobnost výsledků analýzy (např. blízké příbuzné druhy *Bacillus anthracis* a *B. cereus*), ale alespoň v rámci 1 ze 3 vybraných variabilních regionů bylo možné jejich rozlišení.

V rámci studie Yang a kol. (2009) vykazovala HRMA vysokou spolehlivost. Tento přístup identifikace nabízí jednoduchý postup s krátkou dobou identifikace. Navzdory vysoké specifičnosti, ale amplikony rozdílných sekvencí mohou generovat podobné profily tání a spadat tak do jedné skupiny. Další nevýhodou je možnost výskytu polymorfismu v rámci intergenových sekvencí 16S rDNA genu (Yang a kol., 2009).

Chakravorty a kol. (2007) testovali variabilní oblasti V1 – V9 16S rDNA genu (Tab. IV) na 110 bakteriálních druzích (Příloha 10.5) pomocí real-time PCR a sekvencování. Využívali primerů pro jednotlivé variabilní oblasti, a také fluorescenčně značených sond (*Molecular beacon*). Oblast V1 je vhodný pro rozlišení mezi *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus* sp. koagulasa-negativními druhy. Oblasti V2 a V3 jsou vhodné pro charakterizaci všech bakterií na úroveň rodu s výjimkou zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Oblast V2 je nejvhodnější pro rozlišení mezi druhy rodu *Mycobacterium* a V3 mezi druhy rodu *Haemophilus*. Na základě oblasti V6 je možné rozlišit v rámci všech bakteriálních druhů kromě příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae*. Oblasti V4, V5, V7 a V8 jsou méně vhodné.

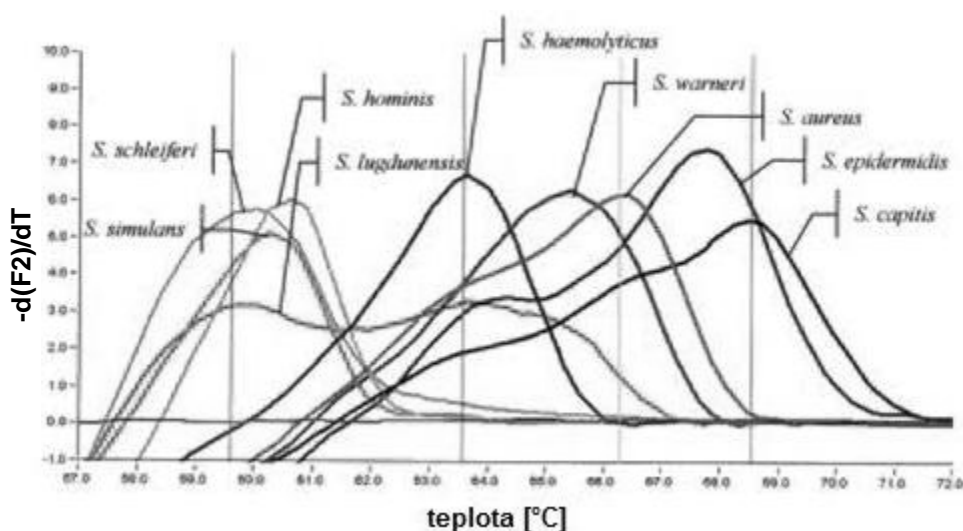
Tab. IV: Oblasti hypervariabilních regionů V1 – V9 16S rDNA (Převzato z Chakravorty a kol., 2007)

Hypervariabilní region	Oblast genu [bp]
V1	69 – 99
V2	137 – 242
V3	433 – 497
V4	576 – 682
V5	822 – 879
V6	986 – 1043
V7	1117 – 1173
V8	1243 – 1294
V9	1435 - 1465

Cheng a kol. (2006) využívali kombinaci broad-range PCR zaměřenou na oblast 16S rDNA genu a analýzy tání pro rychlou detekci a identifikaci klinicky důležitých druhů bakterií. Testováno bylo 46 bakteriálních izolátů, zahrnující 25 klinicky důležitých druhů (Příloha 10.6). Podle teplot tání (T_M) došli k závěru, že 11 z 25 zkoumaných druhů bakterií může být identifikováno přímo a zbývající druhy mohou být rozděleny do 4 skupin a dále identifikovány pomocí tvorby heteroduplexu mezi PCR produkty testovaných a referenčních druhů bakterií (označeny hvězdičkou*) nebo druhé real-time PCR zacílené na jinou oblast 16S rDNA genu (Příloha 10.7).

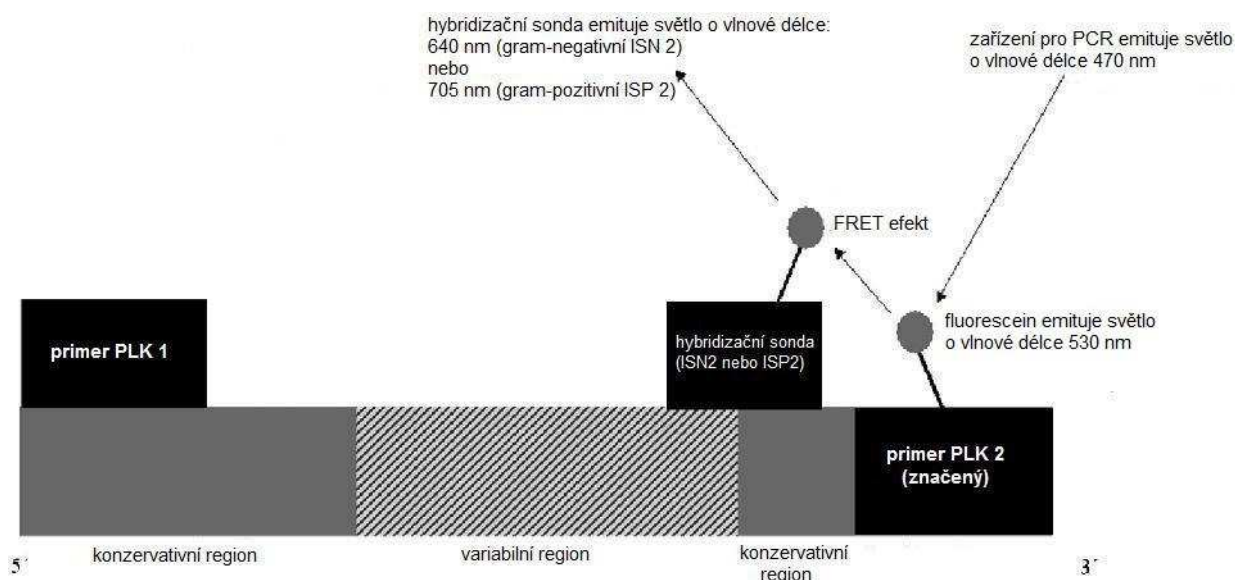
Nedostatkem zmíněné práce je především fakt, že technika PCR-HRMA nebyla testována na širším spektru běžně se vyskytujících druhů bakterií v klinických vzorcích. Nelze se spolehnout, že pokud technika identifikuje kulturu, např. jako *Citrobacter freundii*, nemůže jít o příbuzný a také se často vyskytující *C. koseri*. Podobně je tomu s dvojicí *Klebsiella pneumoniae* a *K. oxytoca* a skupinou *Haemophilus influenzae* a *H. parainfluenzae*, *H. aphrophillus*, *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*. Dále ve studii chybí např. enterobakterie rodu *Providentia*, klinicky významné nefermentující tyčinky *Stenotrophomonas maltophilia* a *Burkholderia cepacia* apod. (Raclavský, ústní sdělení).

Skow a kol. (2005) využíval pro identifikaci v rámci rodu *Staphylococcus* real-time PCR zaměřenou na 16S rDNA gen s následnou analýzou tání dvou FRET sond. Metoda byla testována na 110 izolátech (*S. aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. simulans* a *S. warneri*). Metoda zde dosahovala až 100% přesnosti a poskytuje rychlý a přesný přístup k identifikaci v rámci rodu *Staphylococcus* v klinických laboratořích (Graf 2).



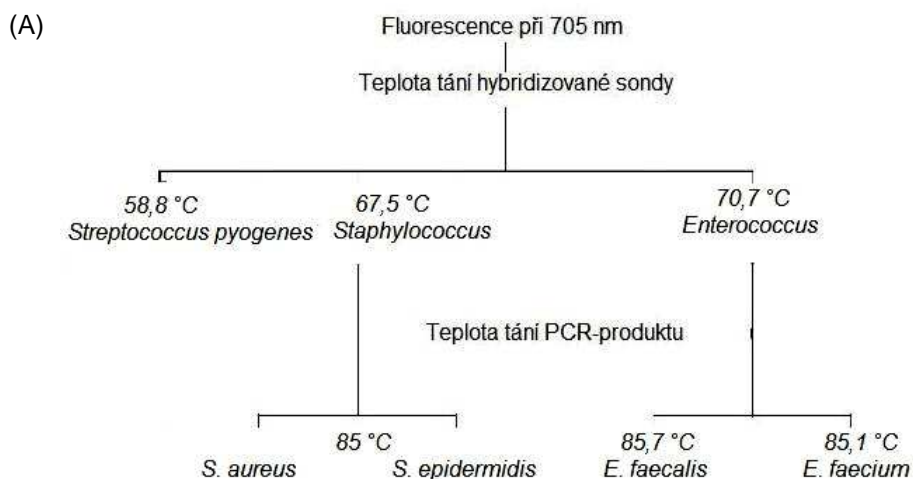
Graf 2: Charakteristické křivky tání pro druhy rodu *Staphylococcus* (Upraveno podle Skow a kol., 2005)

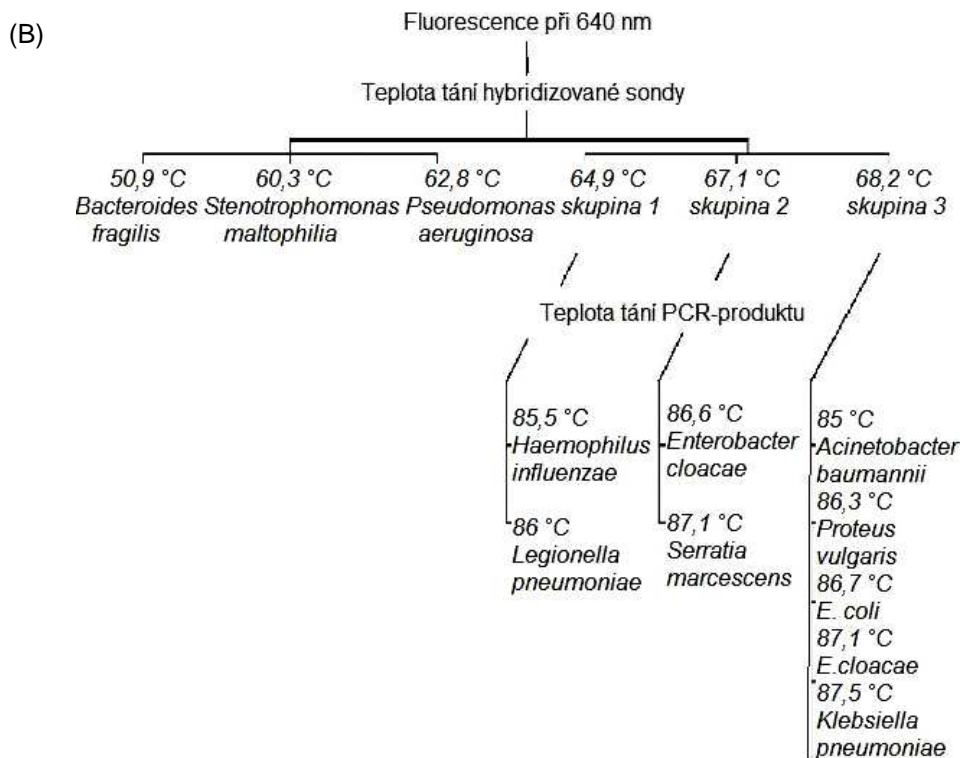
Klaschik a kol. (2004) se zabývali detekcí a identifikací bakterií v biologických tekutinách (např. moč a plazma) kombinací real-time PCR zacílené na oblast 16S rDNA a analýzy tání (Obr. 6). Získali informace o teplotách tání (T_M) dvou molekul – celého PCR produktu a hybridu PCR produkt/sonda, na základě čehož bylo možné provést identifikaci (Schéma 5A,B). Využívali dvou sond – jedna specifická pro produkty získané amplifikací oblasti u Gram-positivních bakterií a druhá u Gram-negativních.



Obr. 6: Schématický pohled na amplifikaci oblasti 16S rDNA; PCR produkt byl ohraničen primery PLK1 a PLK2, z nichž PLK2 byl fluorescenčně značen a tedy schopen excitovat fluorescenci sondy nasedající v sousedství procesem FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) (Upraveno podle Klaschik a kol., 2004)

Schéma 5: Diagnostický diagram pro identifikaci Gram-positivních (A) a Gram-negativních bakterií (B) (Upraveno podle Klaschik a kol., 2004)





Testována zde byla jen vybraná skupina patogenních bakterií (*Acinetobacter baumannii*, *Bacteroides fragilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* a *Streptococcus pyogenes*), bez uvedení počtu testovaných kmenů, a proto platí stejné výhrady jako u dříve zmiňované studie Cheng a kol. (2006). Ze souboru testovaných druhů nebylo možné rozlišit *Staphylococcus aureus* od *S. epidermidis*.

Costa a kol. (2010) se zabývali genotypizací *Candida albicans* pomocí PCR s následnou analýzou tání s vysokým rozlišením (HRMA) a pomocí délkového polymorfismu mikrosatelitů (MLS).

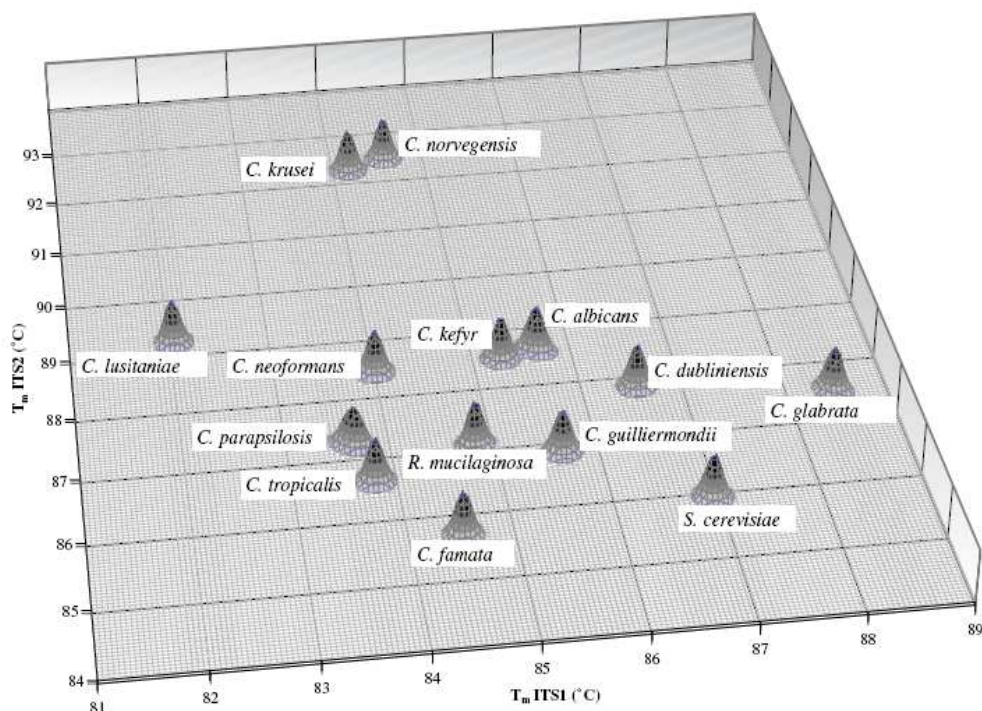
Spolehlivostí a využitelností analýzy křivky tání s vysokým rozlišením při detekci a identifikaci kvasinek rodu *Candida* se zabývali také Plachý a kol. (2005). Analýze tání podrobili produkty tzv. náhodné amplifikace polymorfní DNA (RAPD). Získané derivované křivky tání byly porovnávány vizuálně. V této pilotní studii technika rozlišila pět nejčastěji izolovaných druhů patogenních kvasinek, tj. *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* a *C. tropicalis*. Na práci navázali Trtková a kol. (2009) návrhem nového přístupu k identifikaci kvasinek rodů *Candida* a *Saccharomyces* založeného na RAPD genotypu s následnou McRAPD (*Melting curve of RAPD*) (Tab. V). Vyvinutá technika je

vhodná k identifikaci lékařsky důležitých kvasinek a může být využita pro epidemiologická pozorování.

Tab. V: Srovnání výsledků konvenční fenotypové identifikace, McRAPD a komerční fenotypové identifikace (ID 32C) u vybraných kmenů s diskrepantními výsledky (Převzato z Trtková a kol., 2009)

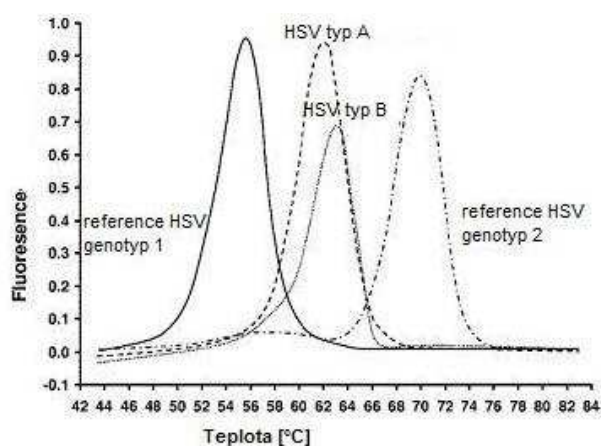
Kmen	Fenotypická identifikace	McRAPD identifikace	ID 32C identifikace
13-CAKR2-35	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
13-CATR9-32	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
13-CATR9-09	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
13-SACE3-07	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
13-SACE3-26	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
11-CAGU2-25	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
11-CAGU2-26	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
11-CAGU2-27	<i>Candida guilliermondii</i>	bez závěru	<i>Candida guilliermondii</i>
CCY 29-4-21	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
11-CAPE2-35	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
11-CAPE2-36	<i>Candida pelliculosa</i>	bez závěru	<i>Candida pelliculosa</i>
CCY 29-6-7	<i>Candida pelliculosa</i>	bez závěru	<i>Candida pelliculosa</i>

Bergman a kol. (2007) se zabývali identifikací patogenních kvasinek rodu *Candida* a *Cryptococcus* spp. (Příloha 10.8). Využívali real-time PCR s následnou analýzou tání s dvourozměrným vyhodnocováním hodnot T_M (Obr. 7). Amplifakce byla zaměřena na dvě oblasti rDNA – ITS-1 a ITS-2. Metoda je vhodná pro identifikaci izolovaných kultur a méně pro přímé použití na klinickém vzorku.



Obr. 7: Dvou-dimenzionální vyhodnocování hodnot T_M (Převzato z Bergman a kol., 2007)

Epsy a kol. (2006) použili PCR-HRMA pro identifikaci *Herpes simplex* viru 1 a 2 (HSV-1 a HSV-2) (Graf 3). Analýza tání byla provedena s využitím hybridizačních sond FRET a *Molecular beacon*.



Graf 3: Křivka tání pro HSV (Upraveno podle Epsy a kol., 2006)

Dalšími možnostmi uplatnění analýzy tání, kromě identifikace bakterií, kvasinek a virů, je např. genotypizace a mutační skenování, ilustrační příklady jsou shrnuty v tabulce VI.

Tab. VI: Souhrnná tabulka příkladů využití analýzy tání s potenciálem ve specifických aplikacích

Použité techniky	Cílová oblast	Účel	Citace
<ul style="list-style-type: none"> • PCR • HRMA • sekvencování 	lidská mitochondriální DNA (mtDNA)	identifikace sekvenčních variant mtDNA (431 variant)	Dobrowolski a kol. (2009)
<ul style="list-style-type: none"> • PCR • HRMA 	jaderné geny pro laktátdehydrogenasu A, lehký řetězec myosinu-2, kyselý ribozomový protein P0 a kalmodulin	mutační skenování, genotypizace (SNPs), diagnostické a populační studie mečouna <i>Xiphias gladius</i>	Smith a kol. (2009)
<ul style="list-style-type: none"> • hybridizace se sondou • asymetrická PCR • analýza tání 	podle navržené sondy	detekce mutací (bodové mutace, malé inserce a delece) a genotypizace	deSilva a Blackett (2007)
<ul style="list-style-type: none"> • PCR • HRMA 	geny <i>acvtIL1</i> (activin A receptor typu II-like 1) a <i>eng</i> (endoglin), jejichž modifikace vedou ke krvácení rozšířených kapilár	detekce heterozygotů, mutační skenování v genetice, onkologii a identifikaci bakteriálních druhů	Vandersteen a kol. (2007)
<ul style="list-style-type: none"> • PCR • analýza tání 	geny <i>htr2A</i> , β -globin (hemoglobiny S a C) a cystickou fibrózu	detekce mutací a genotypizace,	Zhou a kol. (2004); Gundry a kol. (2003); Wittwer a kol. (2003)
<ul style="list-style-type: none"> • PCR • analýza tání 	IgH-R B-lymfocytů pro charakterizaci protilátek	detekce mutací, ověřeno na vzorcích od 131 pacientů s poruchou B-lymfocytů	Xu a kol. (2002)
real-time PCR analýza křivky tání	SNPs lidského paraoxonasa/aryleste rasa genu lidského genu pro apolipoprotein B	genotypizace, testováno na 100 vzorcích z laboratoře Roche Biomedical v rámci dvou SNPs	Germer a Higuchi (1999)

2.2 Gram-negativní nefermentující tyčinky

Rostoucí výskyt infekcí způsobený zástupci nefermentujících Gram-negativních tyčinek (*Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*) je zapříčiněn schopností produkovat široké spektrum hydrolytických enzymů (např. β -laktamasa), které znesnadňují terapii (Endimiani a kol., 2002). V dnešní době již existují automatické systémy pro identifikaci této skupiny patogenů, např. Phoenix, který aplikuje rozsáhlou sadu biochemických testů (Snyder a kol., 2008).

Z hlediska morfologie se jedná o Gram-negativní štíhlé tyčinky s nenáročnou kultivací. Tvoří hladké, lesklé, ploché nebo mírně vypouklé kolonie, které mohou být na krevním agaru doprovázeny zónou úplné hemolýzy a pro některé druhy je typická produkce pigmentů (Votava, 2005).

Většinou se vyskytují přirozeně ve vnějším prostředí (v půdě, vodě, na rostlinách a živočiších), ale za určitých okolností, hlavně u pacientů se sníženou obranyschopností (např. u pacientů s cystickou fibrózou, viz 2.3.1), mohou vést ke vzniku závažných infekcí, většinou nosokomiálních infekcí respiračního a močového traktu, ran a sepsí. Pro lékařskou, veterinární i rostlinolékařskou bakteriologii je z epidemiologického hlediska důležité brát v úvahu možnost ambilaterální (oboustranné) patogenity (Tab. VII) některých druhů bakterií, tedy schopnost vyvolat onemocnění u lidí, zvířat i rostlin (Kúdela a kol., 2002).

Tab. VII: Ambilaterální škodlivost vybraných bakterií z čeledi *Pseudomonadaceae* pro rostliny a člověka (Upraveno podle Kúdela a kol., 2002)

Bakterie	Rostlina	Člověk
<i>Burkholderia cepacia</i>	<ul style="list-style-type: none">• hniloba cibule	<ul style="list-style-type: none">• spojitost s cystickou fibrózou (CF)• kolonizace močových cest• kontaminant dezinfekčních roztoků
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none">• některé hniloby dužnatých orgánů• skvrnitost listů	<ul style="list-style-type: none">• kolonizace dýchacích cest u 40 – 90 % pacientů trpících CF• záněty močových cest, mozkových blan, středního ucha• hnisání kůže po popáleninách

Burkholderia cepacia byla prvně popsána roku 1949 jako původce hniloby cibulovitých rostlin. Teprve později byla popsána jako lidský patogen způsobující

nosokomiální infekce. Závažnost infekce spočívá v primární rezistenci na většinu antibiotik a snadném šíření mezi pacienty s cystickou fibrózou (CF). Spolehlivou metodou detekce *Burkholderia cepacia* přímo v klinickém materiálu je nested-PCR se dvěma páry primerů na oblast genu *recA*, který je konzervován v rámci celého komplexu *B. cepacia*.

Pojem „druh *Burkholderia cepacia*“ je pouhé zjednodušení pro klinickou praxi. Není pouze jedna „*B. cepacia*“, způsobující hnilobu cibule a odpovídající za „cepacia syndrom“ u pacientů s CF. Bylo identifikováno 10 genomovarů (geneticky příbuzných druhů), které tvoří tzv. *Burkholderia cepacia* komplex. Každému genomovaru byl přiřazen binomický název (Tab. VIII). Nejčastěji se vyskytují genomovary II, III a IV. Největší komplikace (zhoršení funkce plic a „cepacia syndrom“) jsou způsobeny genomovarem III (<http://www.lmg.cz/index.php?kategorie=2&lang=cze&skupina=5>).

Tab. VIII: Genomovary *Burkholderia cepacia*

(Převzato z <http://www.lmg.cz/index.php?kategorie=2&lang=cze&skupina=5>)

Genomovar	Rodový a druhový název
I	<i>B. cepacia</i>
II	<i>B. multivorans</i>
III	<i>B. cenocepacia</i>
IV	<i>B. stabilis</i>
V	<i>B. vietnamiensis</i>
VI	<i>B. dolosa</i>
VII	<i>B. ambifaria</i>
VIII	<i>B. anthina</i>
IX	<i>B. pyrrocinia</i>
X (?)	<i>B. ubonensis</i>

Pozn.: Příslušnost *B. ubonensis* (potencionálního genomovaru X) k tzv. *Burkholderia cepacia* komplexu ještě není potvrzena.

2.3 Vybraná onemocnění

2.3.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF), nebo-li mukoviscidosa, je vrozené onemocnění. Pravděpodobnost narození dítěte kavkazoidní rasy trpícího CF je 1:2500 narozených dětí.

V rámci africké a asijské rasy je výskyt vzácnější (1:17 000). Nemoc se projevuje jen u jedinců, kteří mají defektní variantu v genu kódujícího chloridový kanál epitelových buněk (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR*), lokalizovaném na chromosomu 7, v recesivně homozygotní formě.

Jedná se o multisystémové onemocnění charakterizované poruchou funkce žláz s vnější sekrecí (žlázy produkující hlen a potní žlázy) v rámci respiračního a trávicího traktu. V buňkách plic a střev dochází k poruše transportu chloridových iontů (Cl⁻) přes buněčnou membránu a následně také v regulaci jiných kanálů. Výsledkem je akumulace chloridových a sodných iontů mimo buňky, proto setěmto lidem historicky říkalo „slané děti“. Akumulace iontů vede k akumulaci hlenu v plicích, kde následně dochází k uzavírání bronchiol a tím k dýchacím obtížím. V případě střevní formy CF dominuje zahuštění sekretu slinivky břišní s následnou ztrátou produkce trávicích enzymů, které je nutné dodávat. U mužských pacientů dochází k zahuštění seminální tekutiny, uzávěru chámovodu a následné neplodnosti. Onemocnění má nejčastěji plicní projevy, které vedou u většiny pacientů k předčasné úmrtnosti okolo 30-ti let.

Osoby trpící CF jsou zvláště náchylné k plicním infekcím se širokým okruhem bakterií. Typickými patogeny jsou *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* komplex a jiné Gram-negativní nefermentující tyčinky, zahrnující *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* a *Pandoraea* sp. Mezi méně časté organismy u CF pacientů patří druhy rodu *Ralstonia* (Coyene a kol., 2005; Grody, 1999; <http://www.lmq.cz/index.php?kategorie=2&lang=cze&skupina=5>; <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/148824/cystic-fibrosis-CF>).

Šancí pro lidi trpící CF je genová terapie. Vědci využívají rekombinantních technologií a virových vektorů (např. adenoviry), kationových polymerních vektorů nebo kationových liposomů, schopných produkovat normální kopii genu *CFTR*. Stále však ještě nebyla překonána hlavní úskalí genové terapie CF – jak dosáhnout stabilní dlouhodobé exprese zdravého genu (nejlépe dopravením do kmenových hlenotvorných buněk), nebo jak překonat vývoj imunitní reakce proti vektorům při opakovaném podávání transiентně exprimovaných kopií zdravého genu. Hlavním pilířem terapie CF u nemocných s převažující plicní formou onemocnění tak zůstává maximalizace clearance hlenu a boj proti infekcím.

Většina studií zabývajících se problematikou identifikace infekčních agens u pacientů trpících CF ukázala, že *Pseudomonas aeruginosa* je nejčastěji izolovaným druhem a je následován *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* a *Achromobacter xylosoxidans*. Tyto organismy se liší v patogenním potenciálu a v míře přenosnosti z jednoho člověka na druhého a jejich identifikace na druhovou úroveň je z klinického hlediska kritická pro pacienty s CF. Konvenční metody nejsou v těchto případech vždy vhodné, zejména

pro rozlišení genomovarů, a proto bylo vyvinuto několik genetických metod, nejčastěji zaměřených na 16S rDNA gen – PCR-RFLP, SSCP (polymorfismus konformace jednořetězců) a sekvencování (Ferroni a kol., 2002).

Identifikací bakterií izolovaných ze vzorků od pacientů trpících CF se zabývalo několik studií shrnutých v tabulce IX.

Tab. IX: Příklady studií zabývajících se identifikací Gram-negativních tyčinek u pacientů s CF

Použité techniky	Účel	Citace
<ul style="list-style-type: none"> • PCR (16S rDNA gen) • MALDI-TOF MS 	identifikace nefermentujících Gram-negativních tyčinek	Mellmann a kol. (2008)
<ul style="list-style-type: none"> • PCR (16S rDNA gen) 	identifikace v rámci rodu <i>Ralstonia</i>	Coyene a kol. (2005)
<ul style="list-style-type: none"> • SSCP • konvenční testy • systém API 20NE • PCR (16S rDNA gen) 	identifikace Gram-negativních nefermentujících tyčinek	Ferroni a kol. (2002)
<ul style="list-style-type: none"> • komerční systémy • fenotypové testy • enzymatická analýza • AFLP fingerprinting • RFLP • analýza mastných kyselin • PCR (gen <i>recA</i>) 	identifikace Gram-negativních nefermentujících tyčinek, hlavně v rámci <i>Burkholderia cepacia</i> komplexu	Reik a kol. (2005) Coenye a kol. (2001) Henry a kol. (2001) Whitby a kol. (2000)
<ul style="list-style-type: none"> • Rapid NF Plus • API Rapid NFT • automatický systém Vitek a Remel 	identifikace nefermentujících tyčinek, hlavně <i>Burkholderia cepacia</i>	Kiska a kol. (1996)

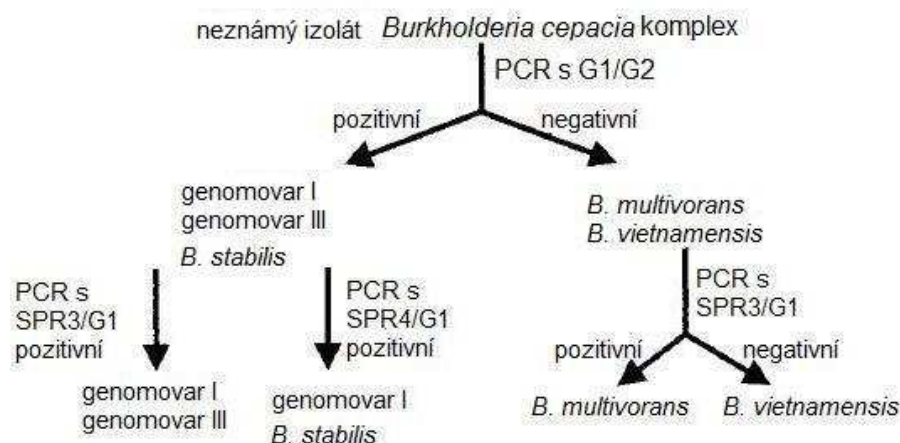
Mellmann a kol. (2008) se ve své studii zabývali detekcí a identifikací nefermentujících Gram-negativních tyčinek 37 rodů zahrnující 248 izolátů (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* aj., Příloha 10.9) z důvodu jejich kolonizace hlavně u lidí trpících CF. Problémem identifikace studované skupiny byly fenotypové změny. PCR byla zaměřena na 16S rDNA gen a pak následovala MALDI-TOF MS (*Matrix-associated laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry*), která je vhodná pro analýzu proteinů.

Problémům CF se ve své studii zabývali Coyene a kol. (2005), kteří se zaměřili na rod *Ralstonia* (*R. basilensis* a *R. metallidurans*). Kvůli rychle se měnící taxonomii tohoto rodu a nedostatku rychlých a spolehlivých metod pro druhovou identifikaci, je výskyt identifikován jako *Ralstonia* sp. Popsali systém PCR zaměřených na 16S rRNA pro druhy *Ralstonia mannitolilytica*, *R. pickettii*, *R. insidiosa* a *R. respiraculi*. Používali dva páry primerů – RalGS-F a RalGS-R amplifikující fragment 16S rDNA genu všech druhů rodu *Ralstonia*, druhý pár Rres-F a Rres-R zaměřen na druhově-specifické sekvence v hypervariabilních oblastech V3 a V8 16S rRNA genu *R. respiraculi*. U pacientů s CF se nejčastěji vyskytují *Ralstonia mannitolilytica*, *Burkholderia cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. gladioli* a *Pandoraea pnomenusa*.

Identifikací atypických nefermentujících Gram-negativních tyčinek, které se vyskytují nejčastěji ve sputu pacientů trpících CF, se zabývali Ferroni a kol. (2002). Pracovali s 1 257 izoláty od 259 pacientů trpících CF, 1 093 byly nefermentující Gram-negativní tyčinky. Vzorky sputa byly rozetřeny po krevním agaru a kultivovány při 35 °C/48 h a následně při 25 °C/6 dní a na Mueller-Hintonově agaru byla určena citlivost k antibiotikům. Vzorky byly identifikovány podle strategie založené na předchozích výsledcích získaných v laboratoři kapilární elektroforézou – SSCP (Příloha 10.10). Dále byly využívány konvenční testy, API 20NE systém (Bio-Merieux) pro fenotypickou identifikaci a PCR zaměřená na 16S rDNA gen. Konvenčními metodami bylo možné identifikovat 1047 izolátů – *Pseudomonas aeruginosa* (1 020), *Achromobacter xylosoxidans* (17), *Stenotrophomonas maltophilia* (7). Genotypové bylo identifikováno 46 izolátů – *Pseudomonas aeruginosa* (19), *Achromobacter xylosoxidans* (10), *Stenotrophomonas maltophilia* (9), *Burkholderia cepacia* genomvar I/III (3), *B. vietnamiensis* (1), *B. gladioli* (1) a *Ralstonia mannitolilytica* (3).

Problémem konvenční identifikace *Burkholderia cepacia* je existence několika genomovarů souhrnně označovaných jako *Burkholderia cepacia* komplex. V rámci komplexu jsou schopnosti identifikace nedostačující. Chronická mikrobiální kolonizace je významnou příčinou chorobnosti a úmrtnosti u lidí trpících CF, a proto je z klinického hlediska nutné rozlišení v rámci této skupiny. U lidí s normální imunitní odpovědí se infekce *B. cepacia* vyskytují sporadicky. Problémem při terapii je odolnost proti většině antimikrobiálních agens. Jsou používány komerční systémy, fenotypové testy, enzymová analýza, AFLP fingerprinting, analýza mastných kyselin a analýza založená na PCR se zaměřením na gen *recA* (Schéma 6) (Reik a kol., 2005; Coyene a kol., 2001; Henry a kol., 2001; Whitby a kol., 2000).

Schéma 6: Identifikace genomovarů *B. cepacia* na základě PCR (Upraveno podle Whitby a kol., 2000)



2.3.2 Chronická obstrukční plicní nemoc

Chronická obstrukční plicní nemoc (*Chronic obstructive pulmonary disease*, COPD, česky CHOPN) je onemocnění charakterizované omezením schopnosti průtoku vzduchu v průdušnicích (bronchiální obstrukce) (Musil a kol., 2005). Jedná se o postupně se zhoršující onemocnění dýchací soustavy, které se vyznačuje poškozením plicní tkáně a je charakterizované řadou symptomů, zejména bronchitidou a destrukcí plicního parenchymu (rozšíření dýchacích cest spojené s destrukcí stěny bez přítomnosti fibrózy) (<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/116147/chronic-obstructive-pulmonary-disease-COPD>).

Výskyt CHOPN vysvětlují dvě teorie – (I.) teorie nerovnováhy mezi proteasami a antiproteasami a (II.) teorie oxidačního stresu (oxidanty v cigaretovém kouři). Vnitřními rizikovými faktory je genetická výbava a vnějšími kouření cigaret, povolání, znečištění ovzduší a rekurentní (opakující se) bronchopulmonární infekce. Genetické příčiny se vyskytují vzácněji, např. genetický defekt, který má za následek nedostatek enzymu α 1-antitrypsinu, hraje roli ve fyziologické opravě plicní tkáně.

Hlavními problémy při CHOPN je vysoká prevalence, morbidita, mortalita a neexistence léku, který by zabraňoval rozvoji této nemoci. Je možné pouze zlepšit kvalitu života nemocných pomocí bronchodilatační léčby (Musil a kol., 2005). Postup onemocnění zhoršují především akutní vzplanutí (exacerbace), které jsou způsobeny mj. virovými nebo bakteriálními infekcemi. Prevence (vakcinace proti chřipce a imunomodulace) a důsledná léčba infekcí je proto podobně jako u cystické fibrózy důležitým pilířem péče o nemocné trpící CHOPN (Raclavský, ústní sdělení).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce bylo:

- 1.** Průběžně (prospektivně) shromažďovat primární izoláty bakterií z klinických vzorků z horních a dolních cest dýchacích pacientů trpících cystickou fibrózou (CF) nebo chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) a provádět nejméně 1× týdně jejich identifikaci pomocí PCR-HRMA.
- 2.** U získaných izolátů shromažďovat výsledky konvenční rutinní identifikace a průběžně je konfrontovat s výsledky identifikace pomocí PCR-HRMA. Případné diskrepance objasnit podrobnou komerční identifikací.
- 3.** Vyhodnotit citlivost, specifitu a přesnost konvenční rutinní identifikace a PCR-HRMA.
- 4.** Zhodnotit potenciál použití PCR-HRMA v rutinní identifikaci nefermentujících Gram-negativních tyčinek získaných z klinického materiálu.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

Bakteriální kmeny vyskytující se u pacientů trpících cystickou fibrózou (CF) nebo chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) byly získány v rámci rutinního provozu Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc v období od září 2009 do září 2010. Takto získané kmeny byly přeočkovány do čisté kultury a následně uloženy do sbírky klinických izolátů bakterií Ústavu mikrobiologie. Ve studii bylo použito celkem 275 klinických izolátů (Tab. X, Příloha 10.11) od 65 pacientů.

Tab. X: Zastoupení jednotlivých rodů/druhů použitých ve studii

Rod/Druh	Zastoupení kmenů		
	CF	CHOPN	Celkem
<i>Acinetobacter</i>	2	3	5
<i>Achromobacter</i>	0	1	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	12	3	15
<i>Enterobacter</i>	4	5	9
<i>Escherichia coli</i>	5	7	12
<i>Klebsiella</i>	7	9	16
<i>Enterococcus</i>	2	2	4
<i>Moraxella catarrhalis</i>	9	5	14
<i>Morganella morganii</i>	0	1	1
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	1
<i>Pseudomonas</i>	43	15	58
<i>Serratia marcescens</i>	0	1	1
<i>Staphylococcus</i>	45	18	63
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	5	6
<i>Streptococcus</i>	38	30	68

Pozn.: + 1 neidentifikovaný vzorek (nenarostl po vyočkování ze sbírky)

Celkové procentuální zastoupení Gram-negativních nefermentujících tyčinek testovaných ve studii je 30,91 % (85/275).

Pro podrobnou PCR-HRMA identifikaci v rámci rodu *Pseudomonas* bylo použito srovnání s referenčními kmeny (Tab. XI) ze sbírky klinických izolátů bakterií Ústavu mikrobiologie, které pocházejí z České národní sbírky typových kultur (CNCTC).

Tab. XI: Použité referenční kmeny pro dodatečnou identifikaci v rámci rodu *Pseudomonas*

Druh	Číslo kmene	Zařazení v rámci CNCTC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P1/51	5537 ^T
<i>Ps. alcaligenes</i>	P1/52	5784 ^T
<i>Ps. amyloclavata</i>	P1/58	5783
<i>Ps. fluorescens</i>	P1/57	5793 ^T
<i>Ps. putida</i>	P1/53	5802 ^T
<i>Ps. stutzeri</i>	P1/54	5484 ^T

4.2 Reagencie

Kultivace kultur:

Columbia krevní agar (Trios s.r.o., Česká republika)

Mueller-Hinton agar (Trios s.r.o., Česká republika)

Reagencie pro izolaci DNA, PCR-HRMA a doplňkové testy:

96% ethanol (Lachema, Česká republika)

aceton (Lachema, Česká republika)

deionizovaná voda (dH₂O)

dNTPs (100 µmol/l) (Promega, USA)

krystalová violeť (Lach-Ner, Česká republika)

LCGreen^{TM Plus+} (BioChem, USA)

Lugolův roztok (Lach-Ner, Česká republika)

NaCl (Lach-Ner, Česká republika)

PCR olej (Top-Bio, Česká republika)

PCR pufr – kompletní (10x) (Top-Bio, Česká republika)

PCR voda (PCR-H₂O) (Top-Bio, Česká republika)

primery 16S-27f 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' (East Port, Česká republika)

16S-519r 5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3' (East Port, Česká republika)

V1f 5'-GYG GCG NAC GGG TGA GTA A-3' (East Port, Česká republika)

V1r 5'-TTA CCC CAC CAA CTA GC-3' (East Port, Česká republika)

V3f 5'-CCA GAC TCC TAC GGG AGG CAG-3' (East Port, Česká republika)

V3r 5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT G-3' (East Port, Česká republika)

V6f 5'-TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A-3' (East Port, Česká republika)

V6r 5'-AGC TGA CGA CAN CCA TGC A-3' (East Port, Česká republika)

safranin (Lachema, Česká republika)

Taq polymerasa (Top-Bio, Česká republika)

Eubakteriální pár primerů 16S-27f (*E. coli*: 8-27 16S rDNA) a 16S-519r (*E. coli*: 536-519 16S rDNA) byl navržen původně pro rod *Mycobacterium*, ale je i vhodný pro nefermentující Gram-negativní tyčinky (<http://rdna2.ridom.de/static/primer.html>; Mellmann a kol., 2008). Páry primerů V1f a V1r, V3f a V3r a V6f a V6r byly převzaty z Yang a kol. (2009).

Komerčně dodávané kity a soupravy:

DNA isolation kit (GeneProof, Česká republika)

identifikační Phoenix bujón s McFarlandovým standardem (Becton-Dickinson, USA)

Phoenix ATS indikátor (Becton-Dickinson, USA)

OXItest (PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika)

souprava ITEST kryobanka B (ITEST plus s.r.o., Česká republika)

4.3 Laboratorní vybavení a software

automatické pipety (LabSystem, Česká republika)

automatický identifikační systém Phoenix (Becton-Dickinson, USA)

bakteriální kličky (Nunc, Dánsko)

biologický termostat BT120 (Labio, Česká republika)

hlubokomrazicí box s příslušenstvím (Sanyo, Japonsko)

chladicí stojan na PCR zkumavky (Eppendorf, Německo)

chlazená centrifuga EBA 12R (Hettich Zentrifugen, Německo)

kahan (Trystom s.r.o., Česká republika)

laboratorní inkubátor (termostat) INCUCCELL (BMT, Česká republika)

laminární box EM Box 180 (Ekom, Česká republika)

mikroskop Olympus CX41 (Olympus, Japonsko)

mikrozkumavky typu Eppendorf (0,2 ml, 1 ml a 1,5 ml) (Eppendorf, Německo)

mini-centrifuga (Labnet International, Velká Británie)

plastové sterilní špičky (10 – 1000 µl) (AlphaLaboratories, Velká Británie)

podložní sklíčka (DispoLab, Česká republika)
RotorGene™ 6000 (Corbett Life Science (Quiqgen), Německo)
tepelný blok Thermo Shaker TS-100 (BioSan, Česká republika)
vortex-Genie2 (Scientific Industries, USA)

Bioedit (volně dostupný program, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)
Excel 2003 (Microsoft, USA)
Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7.40 (Corbett Life Science (Quiagen), Německo)

4.4 Metody

4.4.1 Kultivace bakterií

Postup:

1. Jedna bakteriální kolonie byla přeočkována bakteriální kličkou na Columbia krevní agar a kultivována v inkubátoru při 35 °C po 24 h.
2. Narostlé bakteriální kolonie byly přeočovány do kryozkumavky, která byla označena (název, datum) a uchovávána v hlubokomrazícím boxu při -80 °C.

4.4.2 Izolace DNA komerčním kitem

Izolace DNA byla prováděna pomocí GeneProof DNA isolation kit podle instrukcí výrobce.

Postup:

3. Jedna bakteriální kolonie byla sklizena bakteriální kličkou a suspendována ve 200 µl deionizované vody v 1,5 ml mikrozkuhavce typu Eppendorf.
4. Bylo přidáno 25 µl proteinasy K (koncentrace 22,2 mmol/l), 200 µl pufru 3, směs byla promíchána vortexováním a inkubována 15 min při teplotě 70 °C v tepelném bloku.
5. Bylo přidáno 210 µl 96% ethanolu, vzorek byl přenesen z mikrozkuhavky na kolonku umístěnou v záchytné zkuhavce a centrifugován (11 000 g, 2 min).
6. Kolonka byla přenesena do nové záchytné zkuhavky (collecting tube), bylo přidáno 500 µl promývacího pufru a směs byla centrifugována (11 000 g, 2 min).
7. Kolonka byla přenesena do nové záchytné zkuhavky, bylo přidáno 600 µl pufru 5 a směs byla centrifugována (11 000 g, 2 min).

8. Kolonka byla přenesena do nové záchytné zkumavky a pomocí centrifugace (11 000 g, 2 min) dosušena.
9. Kolonka byla přenesena do nové mikrozukavky (1,5 ml), bylo přidáno 100 µl předeřátého elučního pufru, směs byla inkubována při pokojové teplotě 1 min a centrifugována (11 000 g, 2 min).
10. Mikrozukavka se vzorkem DNA byla označena (název, datum) a použita přímo pro PCR amplifikaci nebo skladována při -20 °C.

4.4.3 Tepelná izolace bakteriální DNA

Postup:

1. Jedna bakteriální kolonie byla odebrána bakteriální kličkou a resuspendována v 50 µl autoklávované dH₂O v 1 ml nebo 1,5 ml mikrozukavce typu Eppendorf.
2. Směs byla inkubována 20 min při teplotě 99 °C a rpm 440 v tepelném bloku.
3. Směs byla centrifugována (13 000 g, 5 min).
4. Bylo odebráno 25 µl supernatantu, mikrozukavka se vzorkem DNA byla označena (název, datum) a použita přímo pro PCR amplifikaci nebo skladována při -20 °C.

4.4.4 PCR s následnou analýzou tání

Postup:

1. Byla připravena reakční směs (Tab. XII).

Tab. XII: Složení reakční směsi pro jednu PCR reakci

Reagencie	Množství [µl]
PCR-H ₂ O	14,24
LCGreen TM Plus+ (10x)	2,0
DNA pufr – kompletní (10x)	2,0
dNTPs (25 mmol/l)	0,16
<i>forward</i> primer (100 µmol/l)	0,1
<i>reverse</i> primer (100 µmol/l)	0,1
<i>Tag</i> polymerasa (5 U/µl)	0,4
DNA templát	1,0

2. Směs byla převrstvena 20 µl PCR oleje a amplifikována v termocykleru RotorGene 6000.

Podmínky PCR reakce:

počáteční denaturace 95 °C, 5 min

1. denaturace 95 °C, 60 s
 2. hybridizace primerů (annealing), 53 °C, 60 s
 3. prodlužování primerů (extension), 72 °C, 90 s
- } 28 cyklů
- konečná extenze primerů, 72 °C, 7 min

Bezprostředně po skončení amplifikace následovala analýza tání s vysokým rozlišením (*High resolution melting analysis*, HRMA) v rozmezí teplot 55-95 °C s rychlostí 0,543 °C/s. Výsledky analýzy tání byly graficky zpracovány do podoby normalizovaných a derivovaných křivek tání pomocí programového vybavení RotorGene™ 6000 v souladu s doporučeními výrobce. Pro zlepšení vizuální čitelnosti průběhu derivovaných křivek bylo použito digitální vyhlazení průběhu křivky s použitím stupně „*heavy digital filter*“.

Celková analýza vzorku pomocí PCR-HRMA trvala 164 min.

4.4.5 Barvení dle Grama

Postup:

1. Na podložní skříčko byla bakteriální kličkou rozetřena kapka fyziologické roztoku (0,9% roztok NaCl) a jedna bakteriální kolonie a po zaschnutí suspenze byla provedena fixace nad kahanem.
2. Bylo provedeno barvení krystalovou violetí po dobu 20 s.
3. Bylo provedeno barvení Lugolovým roztokem po dobu 20 s.
4. Skříčko bylo opláchnuto acetonem a následně destilovanou vodou.
5. Bylo provedeno barvení safraninem po dobu 60 s.
6. Preparát byl vyhodnocen pod mikroskopem.

4.4.6 Test na stanovení aktivity oxidasy

Postup:

Na indikační proužek (OXItest) byla kličkou rozetřena jedna bakteriální kolonie. V případě zpozorování zmodrání je vzorek vyhodnocen jako oxidasa-pozitivní (N,N-dimethyl-1,4-fenyldiamin a α -naftol vytvoří při kontaktu s oxidasou indolfenolovou modř), jinak je oxidasa-negativní.

4.4.7 Ověření identifikace kmenů s výskytem diskrepancí v identifikaci různými metodami

Identifikace kmenů, u kterých se vyskytly diskrepance (rozdíly) mezi výsledkem identifikace na základě vizuálního porovnání křivek tání a rutinní identifikací konvenčními mikrobiologickými postupy byla ověřena pomocí komerčního automatického systému pro identifikaci bakterií (Phoenix).

Postup (dle návodu výrobce):

1. Jednotlivé kolonie byly odebrány bakteriální kličkou z Mueller-Hinton agaru a resuspendovány v identifikačním Phoenix bujónu.
2. Ke kapce Phoenix ATS indikátoru byl přidán bujón se suspenzí.
3. Panel byl vložen do přístroje Phoenix, inkubován při 35 °C a průběžně skenován.

4.4.8 Stanovení citlivosti, specifity a přesnosti konvenční fenotypové identifikace a PCR-HRMA

Citlivost identifikační techniky byla vypočítána jako podíl počtu izolátů, pro které metoda vydala výsledek identifikace, z celkového počtu izolátů, které byly danou identifikační metodou vyšetřeny.

Specifita identifikační techniky byla vypočítána jako podíl počtu izolátů, pro které daná technika nevydala falešný výsledek (tj. vydala správný výsledek nebo nevydala žádný výsledek identifikace), z celkového počtu izolátů.

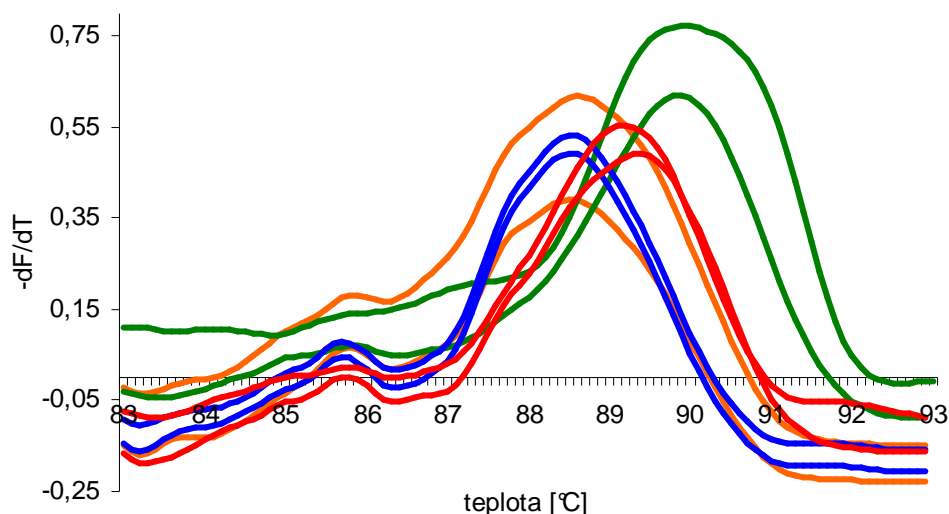
Přesnost identifikační techniky byla vypočítána jako podíl počtu izolátů, pro které daná technika vydala správný výsledek, z celkového počtu izolátů, pro které metoda vydala výsledek identifikace.

5. VÝSLEDKY

Výsledky v rámci předkládané diplomové práce byly získány a zpracovány v laboratořích Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc.

5.1 Srovnání izolace DNA komerční soupravou a pomocí tepelné izolace

Levnější a rychlejší tepelná izolace DNA byla srovnána s izolací DNA pomocí soupravy – GeneProof DNA isolation kit. K amplifikaci byl použit pár primerů 16S-27f a 16S-519r zacílený na oblast 16S rDNA genu. V grafu 4 je demonstrována shoda mezi zmíněnými metodami izolace DNA při analýze tání reprezentativních křivek pro *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Stenotrophomonas maltophilia*. Při tepelné izolaci dosahuje získaná DNA nižší čistoty, obsahuje např. více proteinů a píky jsou širší.

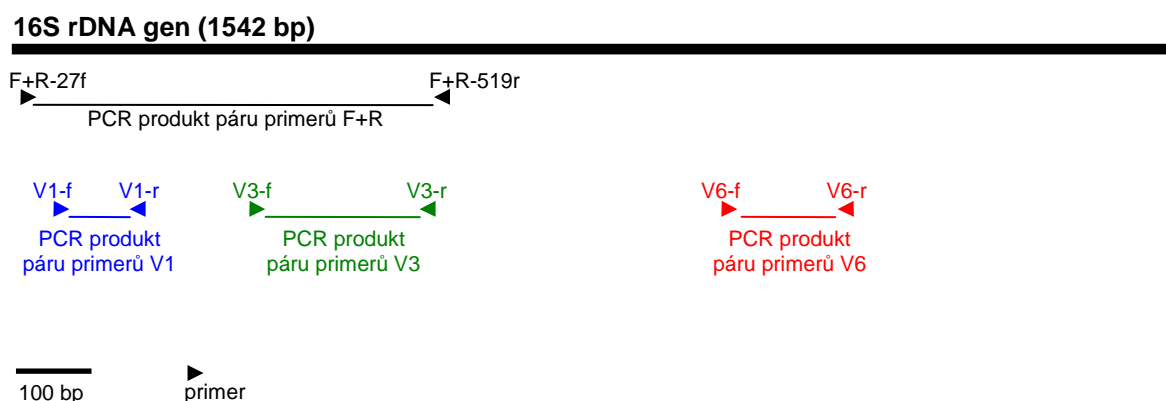


Graf 4: Démonstrace shody při použití izolace DNA pomocí GeneProof DNA isolation kit a tepelné izolace prostřednictvím reprezentativních křivek tání pro *Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Stenotrophomonas maltophilia*.

5.2 16S rDNA gen – oblasti nasedání použitých párů primerů

Páry primerů použité ve studii (F+R, V1, V3 a V6) jsou zaměřeny na 16S rDNA gen (Schéma 7), který obsahuje hypervariabilní oblasti, které jsou vhodným cílem pro identifikaci pomocí genotypových metod. Oblasti nasedání námi použitých primerů (Tab. XIII) byly zjištěny porovnáním sekvencí jednotlivých primerů a 16S rDNA genu.

Schéma 7: 16S rDNA gen se znázorněním nasedání jednotlivých párů primerů



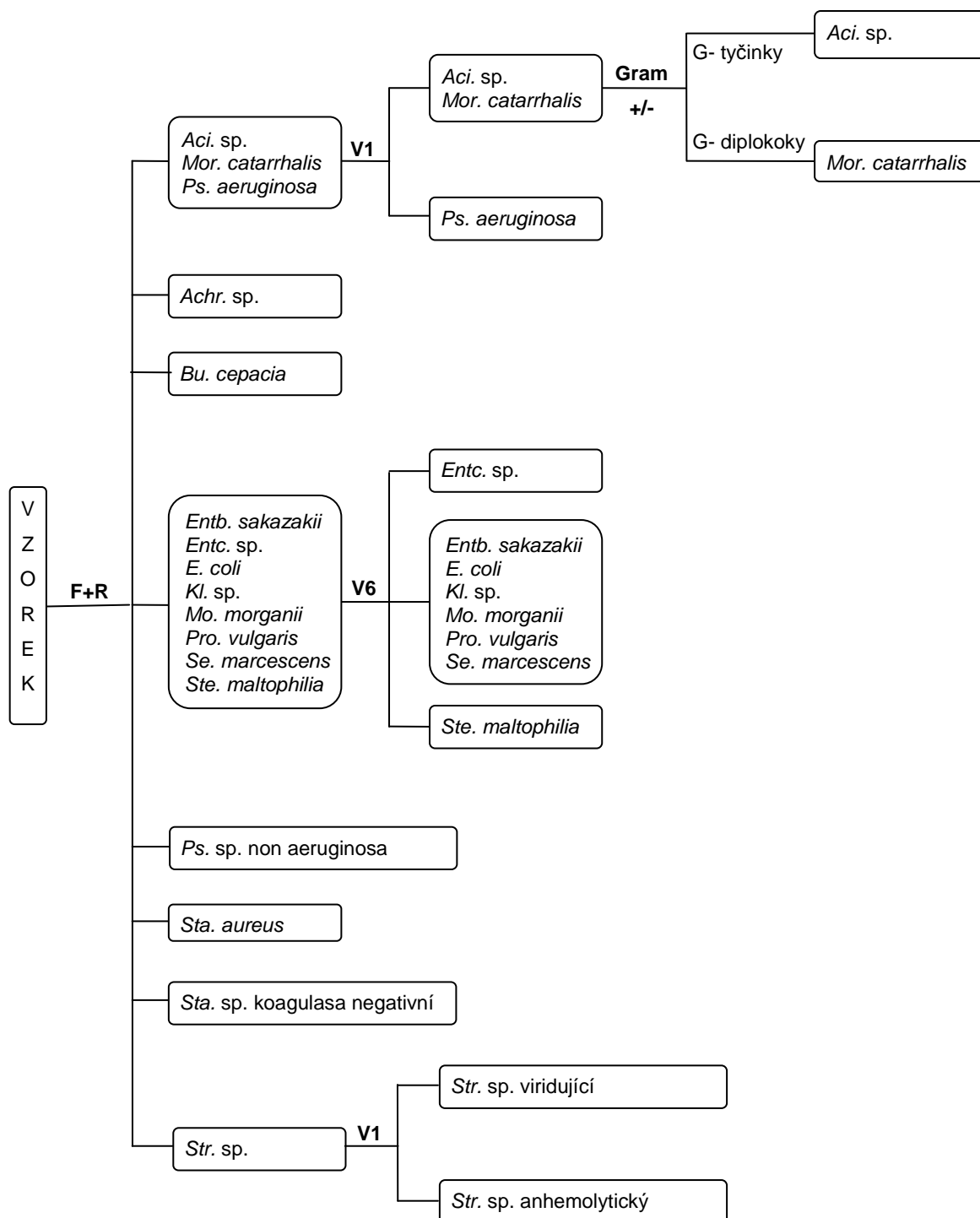
Tab. XIII: Číselné pozice nasedání použitých primerů

Primer		Oblast nasedání primeru [bp]
F+R	16S-27f	8 - 27
	16S-519r	519 - 536
V1	f	46 - 64
	r	109 - 125
V3	f	334 - 354
	r	519 - 537
V6	f	961 - 982
	r	1066 - 1084

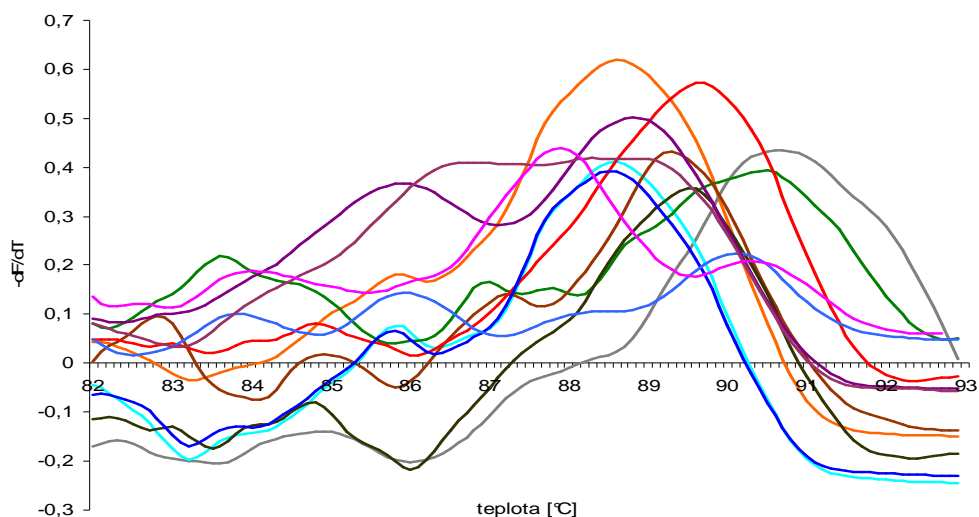
5.3 Algoritmus identifikace

Pro identifikaci případného neznámého vzorku byl vytvořen algoritmus, znázorněný ve schématu 8 a podpořen grafy 5 – 7A-C, které zobrazují reprezentativní křivky tání studovaných kmenů. Algoritmus kombinuje výsledky z analýzy tání a barvení dle Grama.

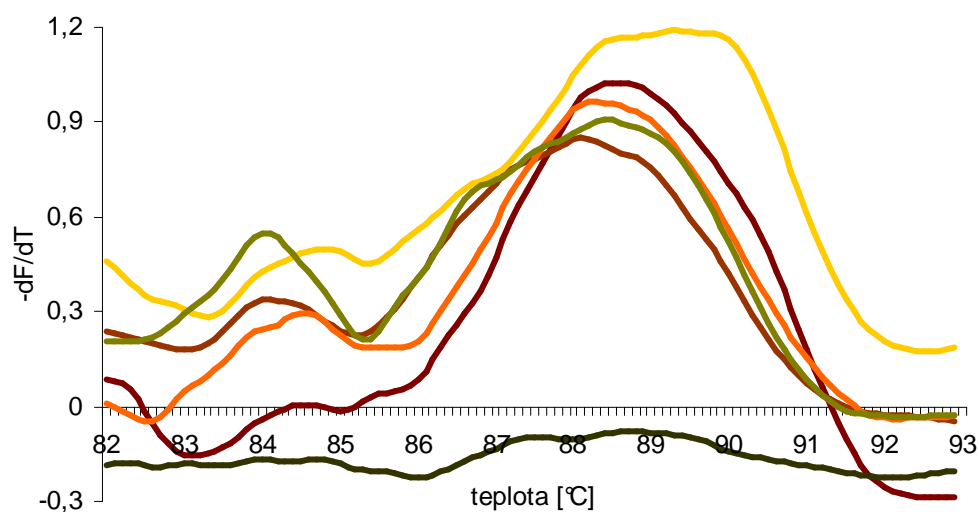
Schéma 8: Algoritmus identifikace bakterií



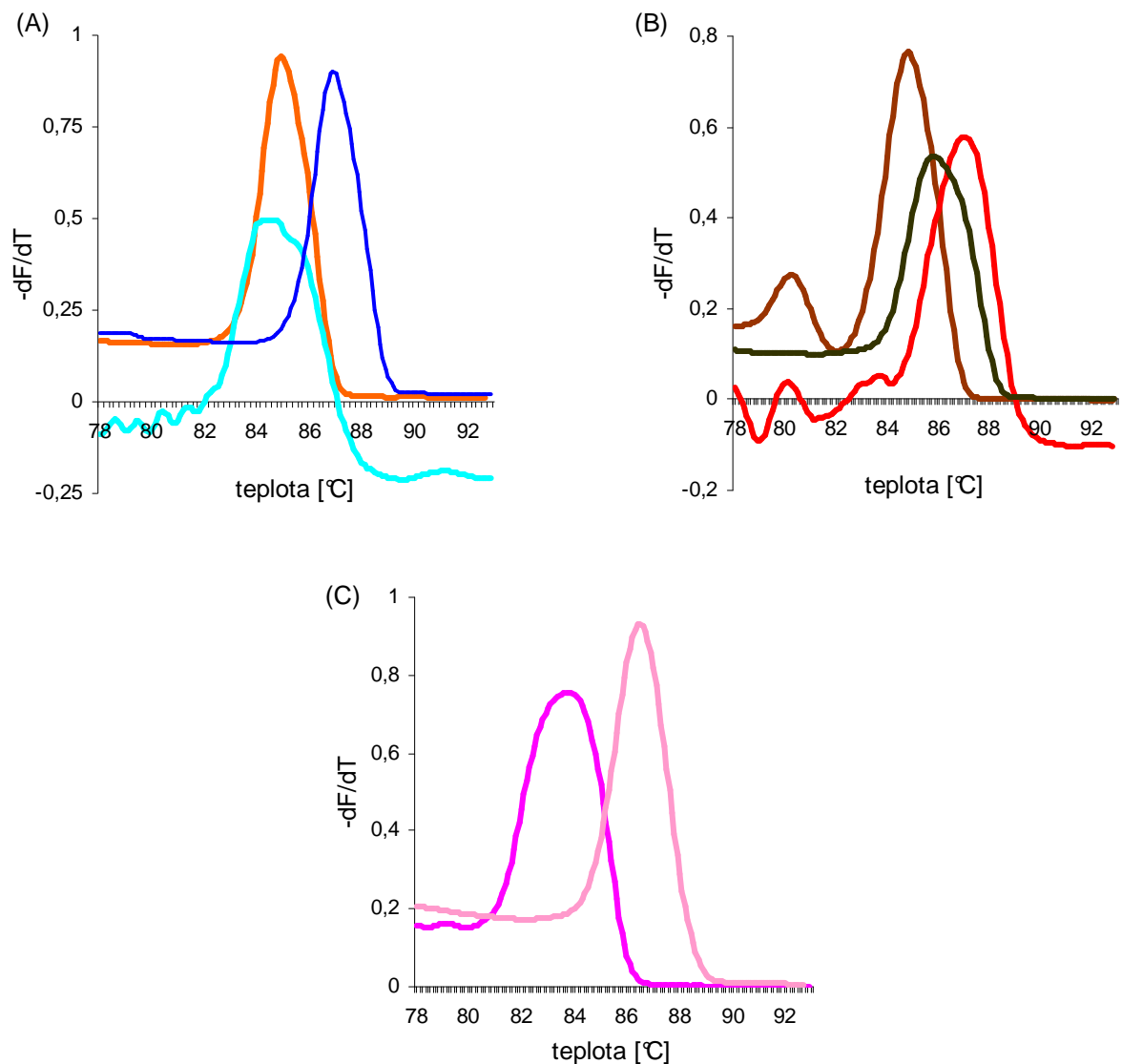
Pozn.: *Aci.* ~ *Acinetobacter*; *Achr.* ~ *Achromobacter*; *Bu.* ~ *Burkholderia*; *Entb.* ~ *Enterobacter*; *Entc.* ~ *Enterococcus*; *E. coli* ~ *Escherichia coli*; *Kl.* ~ *Klebsiella*; *Mor.* ~ *Moraxella*; *Mo.* ~ *Morganella*; *Pro.* ~ *Proteus*; *Ps.* ~ *Pseudomonas*; *Se.* ~ *Serratia*; *Sta.* ~ *Staphylococcus*; *Ste.* ~ *Stenotrophomonas* a *Str.* ~ *Streptococcus*



Graf 5: Demonstrace rozlišení páru prumerů F+R (*Acinetobacter* sp., *Achromobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* sp., *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. koagulasa negativní, *Stenotrophomonas maltophilia* a *Streptococcus* sp.).



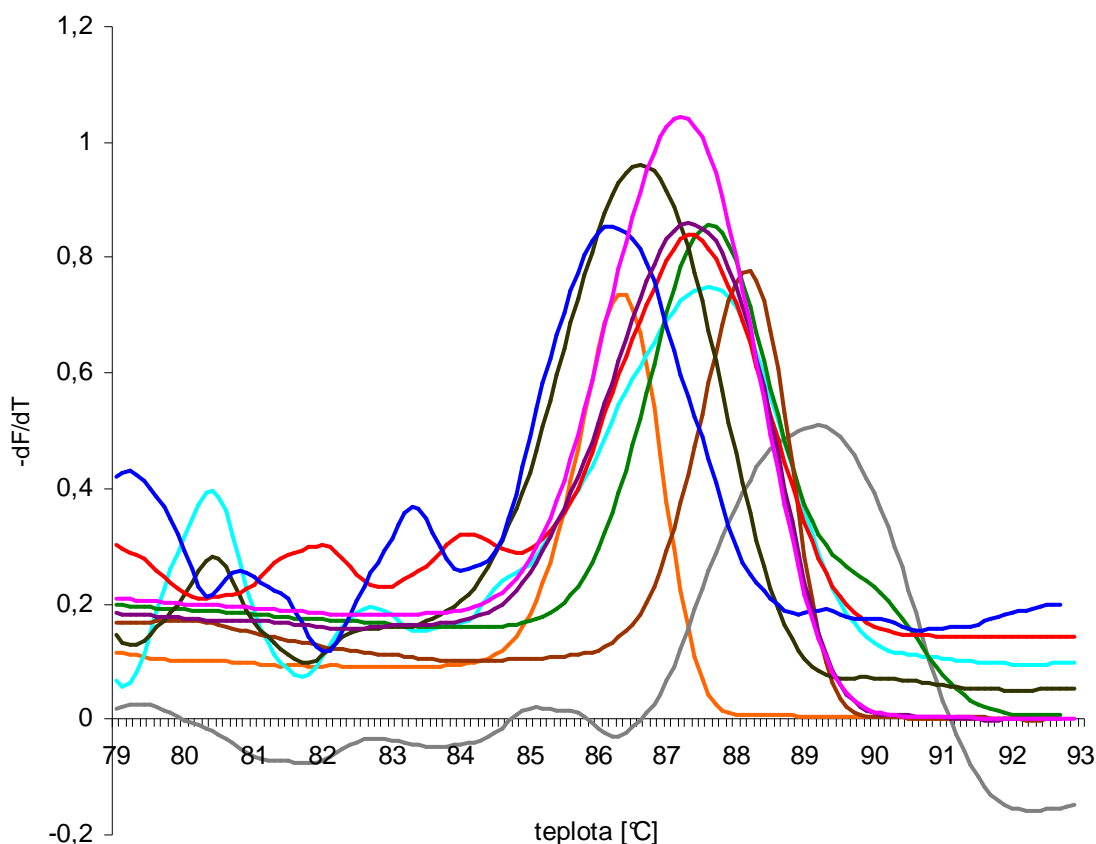
Graf 6: Demonstrace špatného rozlišení v rámci čeledi *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris* a *Serratia marcescens*) pomocí páru prumerů F+R.



Graf 7: Demonstrace rozlišení (A) *Acinetobacter sp.*, *Moraxella catarrhalis* a *Pseudomonas aeruginosa* pomocí páru primerů V1; (B) *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus sp.* a *Stenotrophomonas maltophilia* na základě páru primerů V6 a (C) *Streptococcus sp. viridující* a *Streptococcus sp. anhemolycký* pomocí páru primerů V1.

V naší studii byly použity čtyři páry primerů označené F+R (16S-27f a 16S 519r), V1, V3 a V6, zacílené na variabilní oblasti 16S rDNA genu. Ze získaných výsledků se jako nejvíce perspektivní jeví pár primerů F+R, který byl použit pro počáteční rozdělení. Identifikace skupin, které nebylo možné rozlišit pomocí páru F+R, bylo umožněno jedním z párů primerů V1 a V6. Rody *Acinetobacter* a *Moraxella* lze rozlišit pomocí barvení dle Grama. Ani jeden z použitých párů primerů neumožnil rozlišení v rámci čeledi

Enterobacteriaceae. Nejméně vhodným pro identifikaci druhů použitých ve studii je V3, jak prezentuje graf 8.



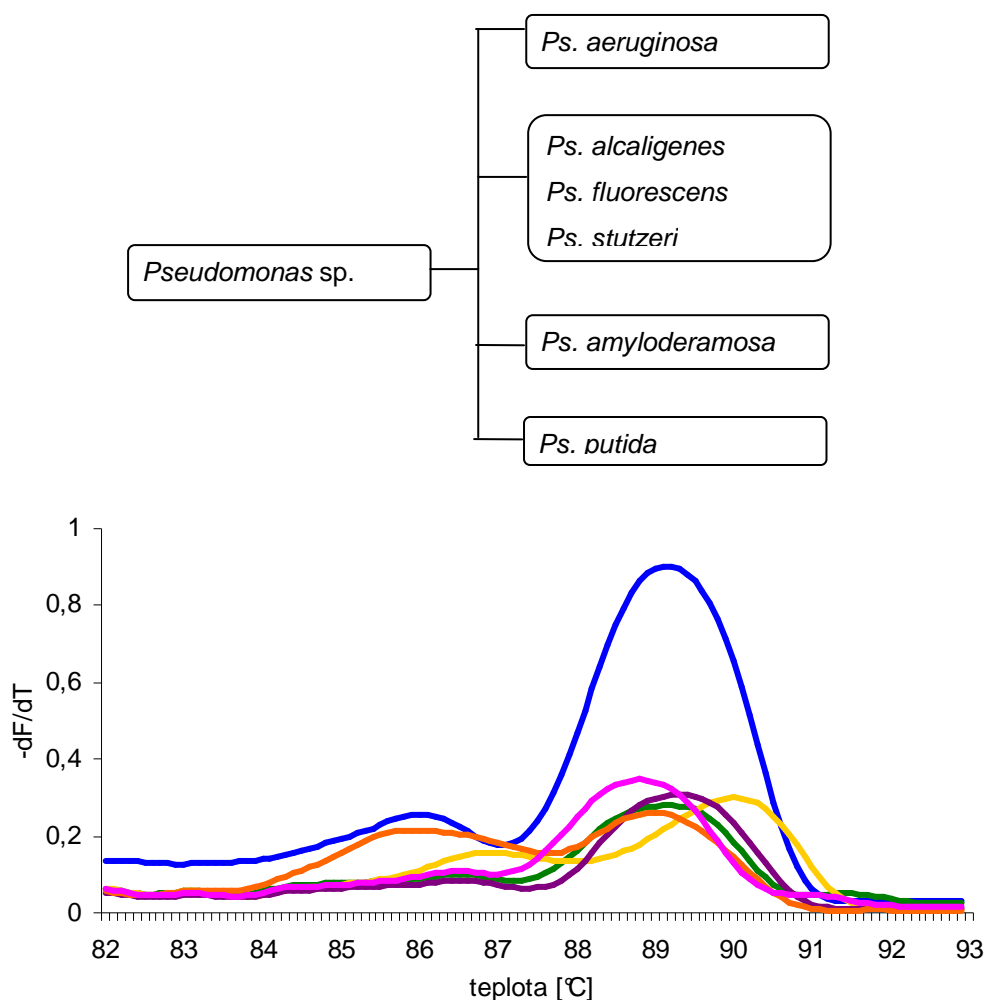
Graf 8: Demonstrace nevhodnosti páru prumerů V3 v identifikaci *Acinetobacter* sp., *Achromobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* sp., *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus* sp. a *Streptococcus* sp.

5.3.1 Rozlišení v rámci *Pseudomonas* sp.

Kromě druhu *Pseudomonas aeruginosa* je možné v klinickém materiálu zachytit i vzácněji se vyskytující druhy, které nejsou v rutinním provozu často podrobně identifikovány a ve výsledku jsou označeny jako *Pseudomonas* sp. V rámci studie byly křivky náležející kmenům, které byly identifikované jako *Pseudomonas* sp., porovnány s křivkami náležícím referenčním kmenům (*Ps. alcaligenes*, *Ps. amyloclavata*, *Ps. fluorescens*, *Ps. putida* a *Ps. stutzeri*) za použití páru prumerů F+R (Schéma 9, Graf 9).

Ze srovnání bylo zjištěno, že kmeny identifikované jako *Pseudomonas* sp., zahrnovaly méně časté kmeny *Ps. alcaligenes/fluorescens/stutzeri* (10) a *Ps. putida* (2).

Schéma 9: Rozlišení v rámci skupiny *Pseudomonas* sp.



Graf 9: Demonstrace rozlišení *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. alcaligenes*, *Ps. amylocleramosa*, *Ps. fluorescens*, *Ps. putida* a *Ps. stutzeri*.

5.4 Podpoření identifikace pomocí barvení dle Grama a testu na stanovení aktivity oxidasy

U každého kmene bylo provedeno barvení dle Grama a poté byly vzorky prohlédnuty pod mikroskopem. U nabarveného mikroskopického preparátu se posuzovalo zda je vzorek Gram-negativní nebo Gram-pozitivní, tvar a případné seskupení buněk (Tab. XIV).

U Gram-negativních tyčinek byl následně proveden test na stanovení aktivity oxidasy (OXItest) (Tab. XIV). U rodu *Pseudomonas* docházelo k tvorbě indolfenolové modři rychle. V rámci rodu *Stenotrophomonas* byla oxidasová aktivita variabilní.

Tab. XIV: Výsledky barvení dle Grama a OXItestu

Rod	Barvení dle Grama (G+/-)	OXItest
<i>Acinetobacter</i> sp.	G- tyčinky (kokobacily)	-
<i>Achromobacter</i> sp.	G- tyčinky	+
<i>Burkholderia cepacia</i>	G- tyčinky	+
<i>Enterobacter</i> sp.	G- tyčinky	-
<i>Escherichia coli</i>	G- tyčinky	-
<i>Klebsiella</i> sp.	G- tyčinky	-
<i>Enterococcus</i> sp.	G+ koky	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	G- diplokoky	+
<i>Morganella morganii</i>	G- tyčinky	-
<i>Proteus vulgaris</i>	G- tyčinky	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	G- tyčinky	+
<i>Serratia marcescens</i>	G- tyčinky	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	G+ koky	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	G- tyčinky	±
<i>Streptococcus</i> sp.	G+ koky	-

5.5 Ověření identifikace pomocí automatického systému Phoenix

V rámci naší studie se v 11 případech objevily diskrepance (rozpory) mezi výsledkem konvenční fenotypové identifikace a na základě vizuálního posouzení křivky tání (HRMA). Tyto kmeny byly podrobeny identifikaci pomocí automatického identifikačního systému Phoenix, který aplikuje oproti konvenční fenotypové identifikaci rozsáhlou sadu biochemických testů. Toto ověření identifikace bylo laskavě provedeno Mgr. Kristýnou Hricovou. Případy diskrepance s výsledky identifikace různými technikami jsou shrnuty v tabulce XV.

Tab. XV: Ověření identifikace kmenů s výskytem diskrepancí

Číslo kmene	Konvenční fenotypová identifikace	HRMA	Phoenix	Doplňkové testy
CF1-65	neidentifikováno	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus gordonii</i>	G+ koky, oxidasa-negativní
CF1-67	Gram-negativní tyčinka	neidentifikováno	<i>Serratia marcescens</i>	G- tyčinky, rezistence ke kolistinu a schopnost štěpit želatinu
CF1-81	neidentifikováno	nepodařilo se vyočkovat ze sbírky		
CF2-37	<i>Achromobacter</i> sp.	neidentifikováno	<i>Achromobacter</i> sp.	G- tyčinky, oxidasa-pozitivní
CF2-48	<i>Haemophilus influenzae</i>	neidentifikováno	<i>Proteus vulgaris</i>	G- tyčinky, rezistence ke kolistinu a krátká biochemická řada (schopnost štěpit močovinu, produkce indolu a sirovodíku)
CF3-01	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	G- tyčinky, oxidasa-negativní
CF3-35	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	G- tyčinky (kokobacily), oxidasa-negativní
CF3-38	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	G- tyčinky, oxidasa-pozitivní
CF4-01	<i>Morganella morganii</i>	neidentifikováno	<i>Morganella morganii</i>	G- tyčinka, rezistence ke kolistinu

Tab. XV: Ověření identifikace kmenů s výskytem diskrepancí - pokračování

Číslo kmene	Konvenční fenotypová identifikace	HRMA	Phoenix	Doplňkové testy
CF4-09	neidentifikováno	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Moraxella catarrhalis</i>	G- diplokoky, butyrát esterasová aktivita (štěpení indoxyl butyrátu)
CF4-16	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Moraxella catarrhalis</i>	G- diplokoky, butyrát esterasová aktivita (štěpení indoxyl butyrátu)

V jednom případě kmen po zamražení a opětovném vyočkování nenarostl. Ve čtyřech případech byl kmen ve sbírce zastoupen pouze jedenkrát, a proto nebylo možné provést srovnání pomocí HRMA, u tří z nich byla potvrzena konvenční fenotypová analýza a u jednoho ne. U čtyř testovaných kmenů byla potvrzena identifikace pomocí HRMA. Tři kmeny nebyly konvenčními fenotypovými metodami identifikovány, u jednoho byla potvrzena identifikace pomocí HRMA a v jednom případě se identifikace nepotvrdila.

5.6 Vyhodnocení citlivosti, specifity a přesnosti konvenční fenotypové identifikace a PCR-HRMA

Při vyhodnocování citlivosti, specifity a přesnosti konvenční fenotypové identifikace ve srovnání s vizuálním hodnocením křivek tání (PCR-HRMA) byl vynechán jeden izolát, který se nepodařilo vyočkovat po uložení do sbírky. Výsledky identifikace studovaných kmenů pomocí konvenční fenotypové identifikace a PCR-HRMA jsou shrnuty v tabulce XVI.

Tab. XVI: Souhrn získaných výsledků identifikace bakterií

		Počet izolátů	Poznámky
Celkový počet kmenů		275	do vyhodnocení zahrnuto 274 kmenů
PCR-HRMA	správná identifikace	268	
	chybná identifikace	2	CF4-09 <i>Acinetobacter</i> sp. → <i>Moraxella catarrhalis</i> CF4-16 <i>Acinetobacter</i> sp. → <i>Moraxella catarrhalis</i>
	neidentifikováno	4	pro nízké zastoupení (jen 1 izolát u každého druhu) nebylo možné provést identifikaci na základě vizuálního srovnání křivek tání CF1-67 <i>Serratia marcescens</i> CF2-37 <i>Achromobacter</i> sp. CF2-48 <i>Proteus vulgaris</i> CF4-01 <i>Morganella morganii</i>
Fenotypová identifikace	správná identifikace	268	
	chybná identifikace	4	CF2-48 <i>Haemophilus influenzae</i> → <i>Proteus vulgaris</i> CF3-01 <i>Haemophilus influenzae</i> → <i>Escherichia coli</i> CF3-35 <i>Enterobacteriaceae</i> → <i>Acinetobacter</i> sp. CF3-38 <i>Acinetobacter</i> sp. → <i>Pseudomonas</i> sp.
	neidentifikováno	2	CF1-65; CF4-09

Výsledky hodnocení citlivosti, specifity a přesnosti jsou shrnuty v tabulce XVII. U obou způsobů identifikace bylo dosaženo vysokých hodnot citlivosti, specifity a přesnosti. Konvenční fenotypová identifikace převyšuje PCR-HRMA v citlivosti, zatímco z hlediska specifity a přesnosti se jeví jako perspektivnější způsob detekce a identifikace bakterií technika PCR-HRMA.

Tab. XVII: Vyhodnocení citlivosti, specifity a přesnosti konvenční fenotypové identifikace a PCR-HRMA

Způsob identifikace	Citlivost [%]	Specifita [%]	Přesnost [%]
PCR-HRMA	98,54	99,27	99,26
konvenční fenotypová identifikace	99,27	98,54	98,53

6. DISKUSE

Předložená diplomová práce je zaměřena na identifikaci patogenních bakterií, hlavně nefermentujících Gram-negativních tyčinek, pomocí techniky PCR s následnou analýzou tání s vysokým rozlišením (*High resolution melting analysis*, HRMA). Pro amplifikaci bylo využito čtyř párů primerů (F+R, V1, V3 a V6), jejichž cílem byl 16S rDNA gen, ve čtyřech paralelních reakcích.

Před zahájením vlastních experimentů byly srovnávány reprezentativní křivky tání nefermentujících Gram-negativních tyčinek (*Acinetobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Stenotrophomonas maltophilia*), jejichž DNA byla extrahována pomocí komerční soupravy nebo tepelnou extrakcí, při použití páru primerů F+R. Při tepelné izolaci dosahuje DNA nižší čistoty, obsahuje např. více proteinů, což se projeví i na průběhu křivky tání a její analýze, kdy píky jsou širší.

V rámci našich experimentů byla metoda testována na kmenech, které byly získány od pacientů trpících cystickou fibrózou nebo chronickou obstrukční plicní nemocí. Jednalo se o zástupce rodů *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* a *Streptococcus*. Jednotlivé druhy je možné identifikovat pomocí algoritmu, který kombinuje vizuální srovnání derivovaných křivek tání, při použití páru primerů F+R, V1 a V6 a barvení dle Grama. Nejvhodnější pro identifikaci byl pár primerů F+R, zatímco V3 nebyl příliš vhodný a nebylo proto ani vhodné ho zahrnout do algoritmu.

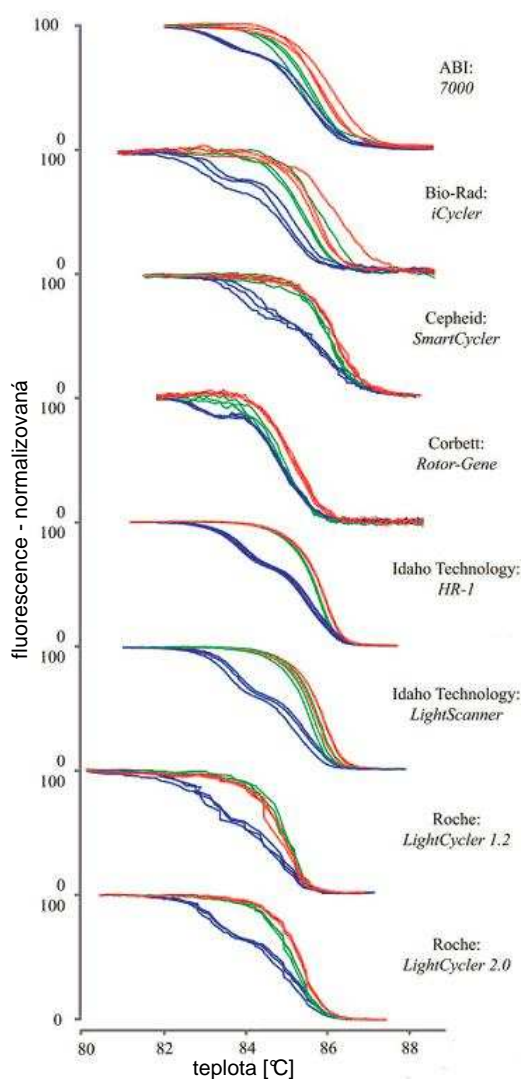
Pomocí kombinace vizuálního srovnání derivovaných křivek tání a barvení dle Grama bylo možné studované rody mezi sebou navzájem rozlišit. Pár primerů F+R rozdělil kmeny zahrnuté ve studii do osmi skupin. Přímou lze identifikovat druhy/rody *Achromobacter* sp., *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp. non *aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. koagulasa negativní a *Streptococcus* sp.

V rámci skupiny tvořené *Acinetobacter* sp., *Moraxella catarrhalis* a *Pseudomonas aeruginosa* bylo možné použitím páru primerů V1 identifikovat *Ps. aeruginosa*. Dvojici *Acinetobacter* sp. a *Moraxella catarrhalis* lze rozlišit pomocí barvení dle Grama, kdy *Acinetobacter* sp. jsou Gram-negativní tyčinky a *M. catarrhalis* Gram-negativní diplokoky.

V rámci rodu *Pseudomonas* bylo možné pomocí páru primerů F+R navzájem rozlišit *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. amyloclavata*, *Ps. putida* a společně druhy *Ps. alcaligenes*, *Ps. fluorescens* a *Ps. stutzeri*, které nelze navzájem rozlišit. Taktéž jde tímto párem primerů odlišit *Staphylococcus aureus* od *Staphylococcus* sp. koagulasa negativních kmenů. Pomocí páru primerů V1 lze rozlišit *Streptococcus* sp. viridující kmeny od *Streptococcus* sp. anhemolytických kmenů.

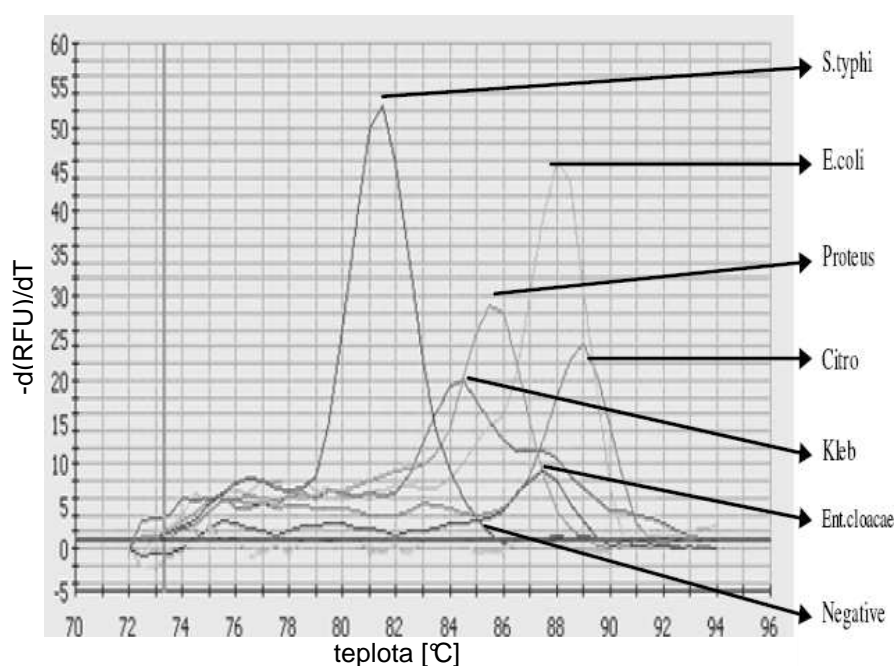
Velkou skupinu tvoří čeleď *Enterobacteriaceae*, jejichž členy nelze pomocí páru primerů F+R rozlišit od *Enterococcus* sp. a *Stenotrophomonas maltophilia*, ale bylo to možné pomocí páru primerů V6. Ani jeden z používaných párů primerů neumožnil rozlišení v rámci čeledi *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* a *Serratia*).

Fakt, že není možné rozlišení na úroveň druhů v rámci čeledi *Enterobacteriaceae* pomocí kombinace párů primerů V1, V3 a V6, je v rozporu s výsledky prezentovanými ve studii Yang a kol. (2009). Tato nesrovnalost je pravděpodobně zapříčiněna použitím rozdílného přístrojového vybavení pro HRMA, kdy jsme používali RotorGene 6000 (Corbett Life Science) a Yang a kol. (2009) používali LightScanner (Idaho Technology). Možností neshodných výsledků při použití rozdílných přístrojů pro HRMA, případně různých integrujících se barviv, se zabývala studie Hermann a kol. (2006) (Graf 10).



Graf 10: Normalizované křivky tání při použití různých přístrojů pro HRMA (Upraveno podle Hermann a kol., 2006)

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, vyskytující se ve střevním traktu, není možné rozlišit pomocí námi testované metody PCR-HRMA zacílené na variabilní regiony V1, V3 a V6 genu 16S rDNA. Tato skutečnost není překvapivá, protože enterobakterie jsou evolučně velmi blízce příbuzné. Pro jejich genetické rozlišení by bylo pravděpodobně nutné se zaměřit cíleně na některé geny sekvenčně dostatečně variabilní v rámci této čeledi, podobně jako ve studii Anbazhagan a kol. (2010), kdy bylo dosaženo rozlišení pomocí použití multiplex PCR s následnou analýzou tání a bylo možno rozlišit *Citrobacter* spp., *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* a *Salmonella typhi* (Graf 11). Multiplex PCR byla realizována se třemi páry primerů ve dvou setech. Primery v rámci prvního setu byly zaměřeny na geny *uidA* (*E. coli*), *ntrA* (*K. pneumoniae*) a *tuf* (*P. mirabilis*) a druhý set na geny 16S rDNA (*C. spp.*), *atpD* (*E. cloacae*) a *viaB* (*S. typhi*). Takový přístup je ovšem nákladnější, komplikovanější a je šitý na míru pouze této skupině bakterií, není univerzálně použitelný na kterýkoli izolát z klinického vzorku.



Graf 11: Křivky tání zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* (Převzato z Anbazhagan a kol., 2010)

Protože naše práce byla primárně zaměřena na klinické vzorky z horních a dolních cest dýchacích u pacientů trpících cystickou fibrózou (CF) a chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN), je klíčovým výsledkem výkonnost PCR-HRMA ve vztahu především

k nefermentujícím Gram-negativním tyčinkám, které jsou dominantními patogeny u dospělých nemocných trpících CF a hrají roli také u části komplikací CHOPN.

Důležitá je také schopnost odlišit spolehlivě *Staphylococcus aureus*, který je významným patogenem dětských nemocných trpících CF, a *Haemophilus sp.* příp. *Moraxella catarrhalis*, které hrají významnou úlohu v akutních exacerbacích (vzplanutích) CHOPN. Téměř u všech těchto druhů poskytuje PCR-HRMA v této práci velmi dobré výsledky. Výjimkou jsou pouze dvě chybné identifikace (CF4-09 a CF 4-16), kdy PCR-HRMA izoláty identifikovala jako *Acinetobacter sp.*, zatímco komerční fenotypová identifikace jednoznačně prokázala *Moraxella catarrhalis*. Pro odstranění této chybovosti, která je zjevně dána malými rozdíly mezi křivkami tání těchto dvou druhů, byly v této práci doplněny jednoduché, rychle, snadno a levně proveditelné dodatečné testy – barvení dle Grama, detekce oxidasové aktivity a detekce butyrát esterasové aktivity (štěpení indoxyl butyrátu). Z těchto testů již samotné barvení dle Grama u *Moraxella catarrhalis* prokáže diplokoky na rozdíl od kokotyčinek *Acinetobacter sp.* Identifikaci lze ještě s konečnou platností potvrdit průkazem butyrát esterasové aktivity jednoduchým papírkovým testem.

PCR-HRMA dále nevydala výsledek identifikace ve 4 případech Gram-negativních tyčinek, což bylo způsobeno nízkým zastoupením těchto druhů ve studovaném souboru, takže nebylo možné výsledek srovnat s dříve nepochybně identifikovaným kmenem. Tento nedostatek by měl být ve většině případů odstraněn při dlouhodobějším používání techniky. Naopak konvenční fenotypová identifikace, i když je metodou používanou mnohem déle – zcela chybně identifikovala ve 4 případech (PCR-HRMA ve 2).

Srovnáme-li výsledky hodnocení citlivosti, specifity a přesnosti, tak lze říct, že vyšší citlivost konvenční fenotypové identifikace (99,27 versus 98,54) je dána právě historicky delším používáním – méně často se u ní vyskytují výsledky, které nelze interpretovat. Naopak vyšší specifita a přesnost PCR-HRMA (99,27 versus 98,54, resp. 99,2 versus 98,5) je dána vyšší exaktností této metody – křivka tání je vždy specifická pro určitý druh, příp. rod nebo skupinu druhů. Proto je mizivá pravděpodobnost, že by jiný druh náhodným selháním metody dokonale napodobil křivku jiného druhu a vedl tak k nesprávné interpretaci výsledku. Z tohoto pohledu se proto PCR-HRMA jeví jako perspektivnější způsob detekce a identifikace bakterií.

Kromě PCR-HRMA je pro identifikaci nefermentujících Gram-negativních tyčinek možno využít např. hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS). Jde o novou fenotypizační techniku, u které bývala udávána problematická reprodukovatelnost výsledků z důvodů různých podmínek kultivace. V poslední době jsou již k dispozici dva rutinní přístroje s databází referenčních křivek a prvotní zkušenosti ukazují, že by mohlo jít o technicky i provozně-ekonomicky výhodnou alternativu. V době vypracovávání této práce ale nebylo

možné naše výsledky přímo srovnat s výsledky dosažitelnými MALDI-TOF MS na našem souboru izolátů.

Z poznatků a studií citovaných v literárním přehledu vyplývá, že analýza tání s vysokým rozlišením je použitelná k detekci a identifikaci klinicky významných druhů bakterií (Chakravorty a kol., 2010; Merchant-Patel a kol., 2010; Yang a kol., 2009; Chakravorty a kol., 2007; Cheng a kol., 2006; Skow a kol., 2005 a Klaschik a kol., 2004), kvasinek (Costa a kol., 2010; Trtková a kol., 2009; Bergman a kol., 2007 a Plachý a kol., 2004) a virů (Epsy a kol., 2006) a dále ve specifických aplikacích jako je genotypizace a mutační skenování.

Molekulárně-genetické metody v porovnání s konvenčními technikami, vedou ke zlepšení v diagnostice vážných infekčních onemocnění. Tyto techniky mohou být aplikovány na sterilní klinické vzorky, čímž se urychlí proces detekce a identifikace, nebo na čisté kultury mikroorganismů, které mohou být následně ještě podrobeny např. testům citlivosti na antibiotika. Mohou být nápomocné v případech, kdy jsou konvenční postupy obtížné.

Testovaný systém identifikace PCR-HRMA v předložené práci sice nepokrývá všechny bakteriální druhy, ale u nefermentujících Gram-negativních tyčinek se jeví jako rychlý, výkonný a spolehlivý způsob identifikace. Kromě dobrého potenciálu pro rozlišení druhů v rámci této zájmové skupiny bakterií je také důležité, že prokázal schopnost správně tyto druhy odlišit od ostatních skupin bakterií, což může být u některých fenotypově atypických izolátů problémem u konvenčních fenotypových metod.

Pokud bude genetický identifikační systém určen pro identifikaci bakteriálních kultur, nikoli pro přímou detekci v klinickém vzorku, může konkurovat fenotypizačním technikám náklady a pravděpodobně i přesností identifikace.

V rámci rutinně používaných fenotypizačních systémů je izolát obvykle nejdříve na základě vzhledu kolonií na agarové půdě přiřazen k určité skupině a až pak jsou použity specifické fenotypizační testy vhodné pro určitou skupinu. Tento postup redukuje potřebu příliš rozsáhlých a prakticky obtížně aplikovatelných univerzálních sad fenotypizačních testů. Podle našeho názoru může být výhodné aplikovat podobnou logiku i v oblasti genetické identifikace kultur bakterií, proto jsme zpracovali v rámci této práce algoritmus vyhodnocování křivek tání zahrnující jako dodatečné diskriminátory a kontrolní uzly i vybrané fenotypové techniky, které lze na izolátu doplňkově provést ihned a s nízkými náklady (barvení podle Grama, detekce oxidasové aktivity apod.).

PCR-HRMA má potenciál pro detekci a identifikaci bakterií, zejména jako metoda předběžného testování v případech, kdy je důležitá rychlá identifikace, např. u pacientů se sníženou obranyschopností organismu, kam patří i lidé trpící cystickou fibrózou nebo chronickou obstrukční plicní nemocí.

7. ZÁVĚRY

Předkládaná diplomová práce splnila zadané cíle:

1. Byly shromážděny primární izoláty bakterií z klinických vzorků pacientů s vybranou skupinou diagnóz (cystickou fibrózou a chronickou obstrukční plicní nemocí), které byly zamraženy do sbírky klinických izolátů bakterií Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc.
2. U získaných izolátů byly shromážděny výsledky základní konvenční rutinní identifikace, které byly průběžně konfrontovány s výsledky identifikace pomocí PCR-HRMA. Diskrepance byly objasněny podrobnou konvenční identifikací prostřednictvím komerčního automatického systému Phoenix.

Ze získaných výsledků lze vyvodit:

1. Konvenční fenotypová identifikace i PCR-HRMA dosahují vysokých hodnot citlivosti, specifity a přesnosti. Studie prokázala vyšší citlivost konvenční fenotypové identifikace (99,27 versus 98,54), ale z hlediska specifity (99,27 versus 98,54) a přesnosti (99,26 versus 98,53) se jako perspektivnější způsob identifikace bakterií jeví technika PCR-HRMA.
2. Technika PCR-HRMA má potenciál pro identifikaci nefermentujících Gram-negativních bakterií, zejména v případech, kdy je důležitá rychlá identifikace, např. u pacientů se sníženou obranyschopností organismu, kam patří i lidé trpící cystickou fibrózou nebo chronickou obstrukční plicní nemocí.

8. POUŽITÁ LITERATURA

Akane A., Matsubara H., Nakamura S., Takahashi S. a Kimura K. (1994): Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *Journal of Forensic Sciences* 39: 362 – 372

Alfaresi M. a Elkosh A. (2006): Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species using real-time PCR with SYBR Green and melting-curve analysis. *Journal of Medical Microbiology* 55: 1711 – 1715

Amann R., Glöckner F-O. a Neef A. (1997): Modern methods in surface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *Microbiology Reviews* 20: 191 - 200

Anbzhagan D., Kanthirvalu G.G., Mansor M., Yan G.O.S. Yusof M.Y. a Sekaran S.D (2010): Multiplex polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of *Enterobacteriaceae* in clinical samples. *African Journal of Microbiology Research* 4 (11): 1186 – 1191

Belkum van A. (2003): High-throughput epidemiologic typing in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection* 9: 86 – 100

Bergman A., Fernandez V., Holmström K.O., Claesson B.E.B. a Enroth H. (2007): Rapid identification of pathogenic yeast isolates by real-time PCR and two-dimensional melting-point analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 26: 813 – 818

Bustin S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169 – 193

Coenye T., Spilker T., Reik R., Vandamme P. a LiPuma J. . (2005): Use of PCR analyses to define the distribution of *Ralstonia* species recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (7): 3463 – 3466

Coenye T., Vandamme P., Govan J. R. W. a LiPuma J. J. (2001): Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (10): 3427 – 3436

Costa J-M., Garcia-Hermoso D., Olivi M., Cabaret O., Farrugia C., Lecellier G., Dromer F. a Bretagne S. (2010): Genotyping of *Candida albicans* using length fragment and high-resolution melting analyses together with minisequencing of a polymorphic microsatellite locus. *Journal of Clinical Methods* 80: 306 – 309

Dahl CH. a Guldberg P. (2007): High-Resolution melting for accurate assessment of DNA methylation. *Clinical Chemistry* 53 (11): 1877 - 1878

deSilva D. a Blackett J. (2007): High-resolution melting & unlabeled probes developing a simple and inexpensive genotyping assay with LunaProbes. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 27 (3), dostupné z: <<http://www.genengnews.com/gen-articles/assay-high-resolution-melting-unlabeled-probes/1986/>>

Dijkshoorn L., Aucken H., Gerner-Smidt P., Janssen P., Kaufmann M.E., Garaizar J., Ursing J. a Pitt T.L. (1996): Comparison of outbreak nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strain by genotypic and phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (6): 1519 – 1525

Dobrowolski S.F., Gray J., Miller T. a Sears M. (2009): Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high-resolution melt (HRM) profiling. *Human Mutation* 30 (6): 891 – 898

Endimiani A., Luzzaro F., Tamborini A., Lombardi G., Elia V., Belloni R. a Toniolo A. (2002): Identification and antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of nonfermenting gram-negative bacteria by the PhoenixTM automated microbiology system. *Microbiologica* 25: 323 – 329

Epsy M. J., Uhl J. R., Sloan L. M., Buckwalter S. P., Jones M. F., Vetter E. A., Yao J. C. D., Wengenack N. L., Rosenblatt J. E., Cockerill III. F. R. a Smith T. F. (2006): Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19 (1): 165 – 256

Erali M., Voelkerding K.V. a Wittwer C.T. (2008): High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and Molecular Pathology* 85 (1): 50 – 58

Ferroni A., Sermet-Gaudelus I., Abachin E., Quesne G., Lenoir G., Berche P. a Gaillard J.-L. (2002): Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (10): 3793 – 3797

Germer S. a Higuchi R. (1999): Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. *Genome Research* 9: 72 – 78

Grody W. W. (1999): Cystic fibrosis – Molecular diagnosis, population screening and public policy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 123: 1041 – 1046

Gundry C. N., Vandersteen J. G., Reed G. H., Pryor R. J., Chen J. a Wittwer C. T. (2003): Amplicon melting analysis with labeled primers: A closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry* 49 (3): 396 – 406

Henry D. A., Mahenthalingam E., Vandamme P., Coenye T. a Speert D. P. (2001): Phenotypic methods for determining genomic status of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (3): 1073 – 1078

Hermann M.G., Durtschi J.D., Bromley K.L., Wittver C.T. a Voelkerling K.V. (2006): Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: Cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clinical Chemistry* 52 (3): 494 – 503

Chakravorty S., Aladegbami B., Burday M., Levi M., Marras S.A.E., Shah D., El-Hajj H.H., Kramer F.R. a Alland D. (2010): Rapid universal identification of bacterial pathogens from clinical cultures by using a novel sloppy molecular beacon melting temperature signature technique. *Journal of Clinical Microbiology* 48 (1): 258 – 267

Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N. a Alland D. (2007): A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 69: 330 – 339

Cheng J.-Ch., Huang Ch.-L., Lin Ch.-Ch., Chen Ch.-Ch., Chang Y.-Ch., Chang S.-S. a Tseng Ch.-P. (2006): Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR. *Clinical Chemistry* 52 (11): 1997 – 2004

Ieven M., Loens K. a Goossens H. (2004): Detection and characterization of bacterial pathogens by nucleic acid amplification: State-of-the-art review, *Molecular microbiology*. In: Persing D. H. a kol. (Eds.): *Diagnostic principles and practice*. 323 – 341, ASM Press, Washington, D.C.

Kiska D. L., Kerr A., Jones M. C., Caracciolo J. A., Eskridge B., Jordan M., Miller S., Hughes D., King N. a Gilligan P. H. (1996): Accuracy of four commercial systems for identification on *Burkholderia cepacia* and other Gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (4): 886 – 891

Kristensen L. S., Mikeska T., Krypuy M a Dobrovic A. (2008): Sensitive melting analysis after real-time-methylation specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. *Nucleic Acids Research* 36 (7, e42), dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/content/36/7/e42.full.pdf+html>

Klaschik S., Lehmann L. E., Raadts A., Book M., Gebel J., Hoeft A. a Stuber F. (2004): Detection and differentiation of in vitro-spiked bacteria by real-time PCR and melting-curve analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (2): 512 – 517

Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömborn L., Ståhlberg A a Zoric N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95 – 125

Kůdela V., Novacky A. a Fucikovsky L. (2002): *Rostlinolékařská bakteriologie*. 31 – 87, Academia, Praha

Louie M., Louie L. a Simor A. E. (2000): The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious disease. *Canadian Medical Association Journal* 163 (3): 301 – 309

Lyon E. a Wittwer C.T. (2009): LightCycler technology in molecular diagnostics. *Journal of Molecular Diagnostics* 11 (2): 93 – 101

Mackay I. M., Arden K. E. a Nitsche A. (2002): Survey and summary real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30 (6): 1292 – 1305

Maiwald M. (2004): Broad-range PCR for detection and identification of bacteria. In: Persing a kol. (Eds.): *Diagnostic principles and practice*. 379 – 388, ASM Press, Washington, D.C.

Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckevoet U., Ramminger I., Iwen P., Dunn J., Hall G., Wilson D., LaSala P., Kostrzewa M. a Harmsen D. (2008): Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (6): 1946 – 1954

Merchant-Patel S., Blackall P.J., Templeton J., Price E.P., Tong S.Y.C., Huygens F. a Giffard P.M. (2010): *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (2): 493 – 499

Motgomery J., Wittwer C. T., Kent J. O. a Zhou L. (2007): Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clinical Chemistry* 53 (11): 1891 – 1898

Musil J., Konšťacký S., Kašák V., Salajka F. a Jindrák V. (2005): Chronická obstrukční choroba plicní – doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. Společnost všeobecného lékařství, Praha

O'Hara M. (2005): Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli. *Clinical Microbiology Reviews* 18 (1): 147 - 162

Olive M. D. a Bean P. (1999): Minireview: Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organism. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (6): 1661 – 1669

Patel V. (2009): High-resolution melt analysis applications. *Genetic Engineering and Biotechnology News* 29 (18), dostupné z: <<http://www.genengnews.com/gen-articles/high-resolution-melt-analysis-applications/3072/>>

Plachý R., Hamal P. a Raclavský V. (2005): McRAPD as a new approach to rapid and accurate identification of pathogenic yeasts. *Journal of Microbiological Methods* 60: 107 – 113

Reik R., Spilker T. a LiPuma J. J. (2005): Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from person with or without cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (6): 2926 – 2928

Reischl U. (2006): Melting of the ribosomal RNA gene reveals bacterial species identity: A step toward a new rapid test in clinical microbiology. *Clinical Chemistry* 52 (11): 1985 - 1987

Rompré A., Servais P., Baudart J., de-Roubin M-R. a Laurent P. (2002): Detection and enumeration of coliform in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods* 49: 31 – 54

Skow Á., Mangold K. A., Tajuddin M., Huntington A., Fritz B., Thomson R. B. jr. a Kaul K. L. (2005): Species-level identification of staphylococcal isolates by real-time PCR and melt curve analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (6): 2876 – 2880

Smith B. L., Lu C.-P. a Bremer J. R. A. (2009): High-resolution melting analysis (HRMA): a highly sensitive inexpensive genotyping alternative for population studies. *Molecular Ecology Resources*, dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2009.02726.x/pdf>

Snyder J.W., Munier G.K. a Johnson C.L. (2008): Direct comparison of the BD Phoenix system with the MicroScan walkaway system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* and Nonfermentative Gram-negative organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (7): 2327 – 2333

Sussman M. (2001): Molecular medical microbiology: The concept. In: Sussman M. (Ed.): *Molecular medical microbiology I*. 1 – 4, Academic Press, Londýn

Tang Y.-W., Ellis N. M., Hopkins M. K., Smith D. H., Dodge D. E. a Persing D. H. (1998): Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 36 (12): 3674 – 3679

Trtková J., Pavlíček P., Rusková L., Hamal P., Koukalová D. a Raclavský V. (2009): Performance of optimized McRAPD in identification of 9 yeast species frequently isolated from patient samples: potential for automation. *BMC Microbiology* 9: 234 – 255

Trtková J. a Raclavský V. (2006): Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeast. *Biomedical Paper of Medicine Faculty of University Palacky Olomouc Czech Republic* 150 (1): 51 – 61

- Vandersteen J. G., Bayrak-Toydemir P., Palais R. A. a Wittwer C. T. (2007): Identifying common genetic variants by high-resolution melting. *Clinical Chemistry* 53 (7): 1191 – 1198
- Vossen R. H. A. M., Aten E., Roos A. a Dunnen den J. T. (2009): High-resolution melting analysis (HRMA) – more than just sequence variant screening. *Human Mutation* 30 (0): 1 – 7
- Votava M. (2005): *Lékařská mikrobiologie – obecná*. Neptun, Brno
- Whitby P. W., Carter K. B., Hatter K. L., LiPuma J. J. a Stull T. L. (2000): Identification of members of the *Burkholderia cepacia* complex by species-specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (8): 2962 – 2965
- Wittwer C. T., Reed G. H., Gundry C. N., Vandersteen J. G. a Pryor R. J. (2003): High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49 (6): 853 – 860
- Wittwer C.T. (2009): High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human Mutation* 30 (6): 857 – 859
- Xu D., Du J., Schultz C., Ali A. a Ratech H. (2002): Rapid and accurate detection of monoclonal immunoglobulin heavy chain gene rearrangement by DNA melting curve analysis in the LightCycler system. *Journal of Molecular Diagnostics* 4 (4): 216 – 222
- Yang S., Ramachandran P., Rothman R., Hsieh Y.-H., Hardick A., Won H., Kecojevic A., Jackman J. a Gaydos Ch. (2009): Rapid identification of biothreat and other clinically relevant bacterial species by use of universal PCR coupled with high-resolution melting analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 47 (7): 2252 – 2255
- Zaidi N., Konstantinou K. a Zervos M. (2003): The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Molecular Methods in Human Infections* 127: 1098 – 1105
- Zhou L., Myers A. N., Vandersteen J. G., Wang L. a Wittwer C. T. (2004): Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clinical Chemistry* 50: 1328 – 1335

Další použité zdroje:

<http://rdna2.ridom.de/static/primer.html>

<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_070383.pdf

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/116147/chronic-obstructive-pulmonary-disease-COPD>

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/148824/cystic-fibrosis-CF>

<http://www.lmg.cz/index.php?kategorie=2&lang=cze&skupina=5>

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

<http://www.pr-lab.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf>

9. POUŽITÉ ZKRATKY

A	adenin
ACVRL1	aktinový receptor typu II, <i>actinA receptor type II – like 1</i>
AP-PCR	metoda identifikace založená na polymorfismu amplifikovaných fragmentů, RAPD
<i>atpD</i>	gen kódující β -podjednotku ATP synthasy
ATCC	Americká sbírka typových kultur
bp	pár bází, <i>bases pair</i>
C	cytosin
CARD-FISH	citlivější varianta FISH, používá se sonda s křenovou peroxidasou
CDC3 lokus	protein buněčného cyklu s rolí v G1 fázi, kódován cyklin dependentní kinasou 3
cDNA	komplementární DNA, vzniká přepisem z RNA
CF	cystická fibróza
CFTR	transmembránový regulátor u cystické fibrózy
ddNTP	dideoxyribonukleosidtrifosfát, ukočňuje syntézu nového řetězce
dH ₂ O	deionizovaná voda
dNTPs	směs deoxyribonukleosidtrifosfátů
dsDNA	double-stranded DNA, dvouřetězcová molekula DNA
EF1A	elongační faktor 1A, působí při prodlužování syntetizovaného řetězce
<i>eng</i>	gen pro endoglobin
ERIC	repetitivní mezigenové sekvence vyskytující se u enterobakterií, <i>Enerobacterial repetitive intergenic consensus</i>
f	<i>forward primer</i>
F2/5	koagulační faktor (2 – protrombin, 5 – proakcelerin) v procesu srážení krve (hemokoagulace)
<i>flaA</i>	gen kódující flagelin A
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i> , typ hybridizační sondy
G	guanin
<i>gyrB</i>	gen kódující DNA gyrasu B, enzym důležitý pro správný průběh replikace DNA též topoizomeráza II, umožňující „zavíjení a rozvíjení“ replikované DNA
HRMA	analýza tání s vysokým rozlišením, <i>High resolution melting analysis</i>
<i>hsp65</i>	gen kódující <i>heat shock protein 65</i>
HSV	virus Herpes simplex
<i>htr2A</i>	gen pro 5-hydroxy-tryptaminový receptor 2A

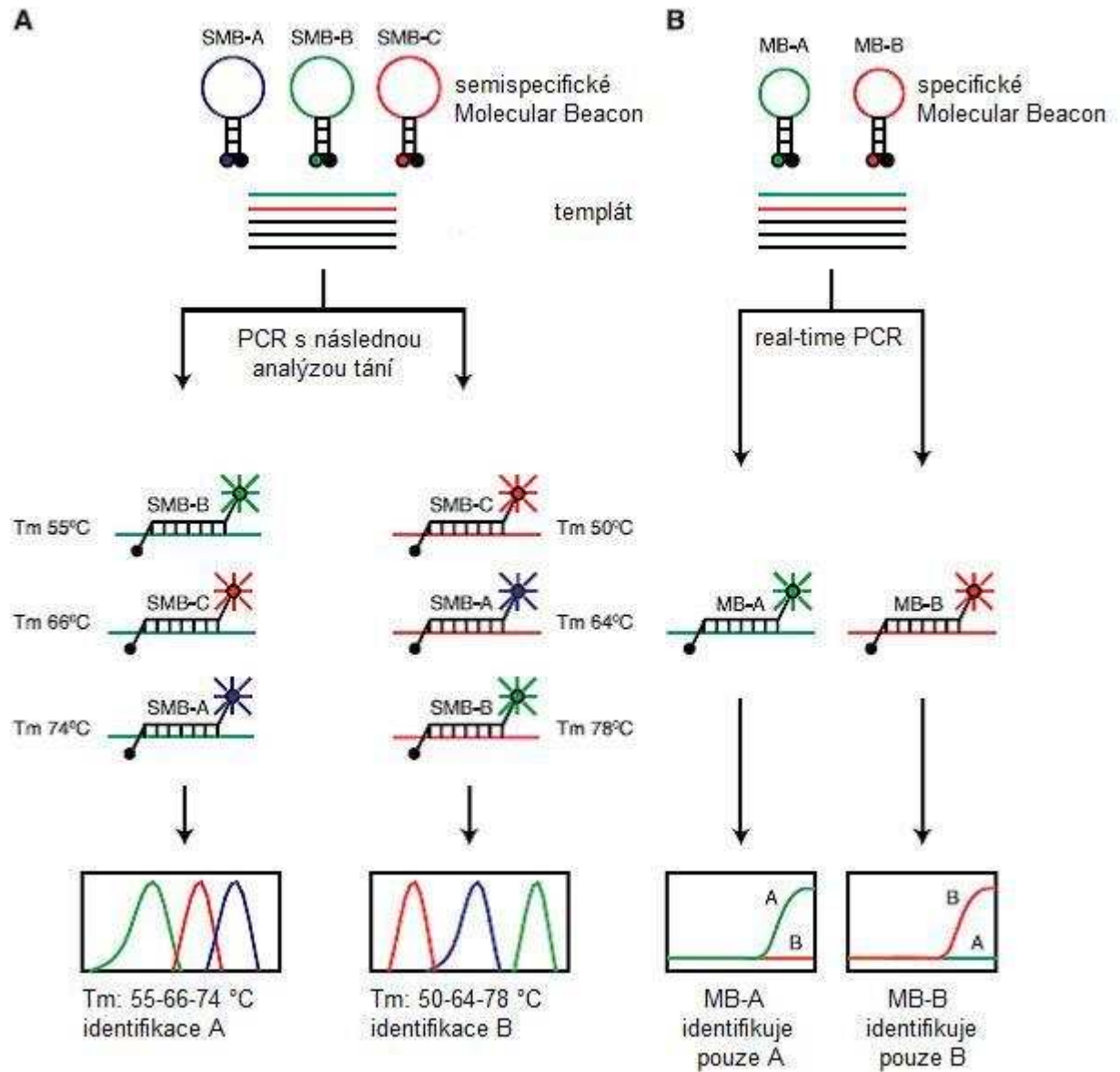
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc, <i>chronic obstruction pulmonary disease</i>
ITS	vnitřní přepisovaný mezerník mezi jednotlivými geny, <i>Internal trascribed spacer</i>
McRAPD	<i>Melting curve RAPD</i> , analýza tání produktů RAPD
MLST	multilokusová sekvenční typizace,
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
mtDNA	mitochondriální DNA
<i>mthfr</i>	gen pro metyilentetrahydrofolát reduktasu
NCBI	mezinárodní databáze sekvencí, <i>National center for biotechnology information</i>
<i>ntrA</i>	gen pro regulaci vnitrobuněčné koncentrace NH_4^+
Q β	typ fága, který replikuje svůj genom pomocí RNA polymerasy
r	<i>reverse primer</i>
rDNA	ribosomální DNA
<i>recA</i>	gen
Rep	repetitivní extragenová palindromatická sekvence, <i>Repetitive extragenic palindromic sequence</i>
<i>rpoB</i>	gen kódující podjednotku β RNA polymerasy
rRNA	ribosomální RNA
SNP	jedno-nukleotidový polymorfismus, <i>single-nucleotide polymorfism</i>
SSCP	polymorfismus konformace jednořetězců
ssDNA	single-stranded DNA, jednořetězcová molekula DNA
SVR	krátký variabilní region
T	thymin
T_M	teplota tání, <i>melting temperature</i>
<i>tuf</i>	gen pro elongační faktor
<i>uidA</i>	reportérový gen pro glukuronidasu (GUS)
V1-9	variabilní region genu 16S rDNA
<i>viaB</i>	gen kódující Vi antigen u <i>Salmonella typhi</i>

10. PŘÍLOHY

10.1 Druhy bakterií použité ve studii Tang a kol., 1998

Schopnost fermentace	Druh	Počet
fermentující	<i>Citrobacter braakii</i>	1
	<i>C. farmeri</i>	1
	<i>C. koseri</i>	2
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	6
	<i>E. agglomerans</i>	1
	<i>E. cloacae</i>	6
	<i>Escherichia coli</i>	3
	<i>Klebsiella cryocrescens</i>	1
	<i>K. oxytoca</i>	1
	<i>K. pneumoniae</i>	1
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1
	<i>Pasteurella multocida</i>	2
	<i>Providencia rettgeri</i>	1
	<i>P. stuartii</i>	1
	<i>Serratia odorifera</i>	1
nefermentující	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1
	<i>A. xylosoyidans</i>	3
	<i>Brevundimonas diminuta</i>	1
	<i>B. vesicularis</i>	1
	<i>Burkholderia cepacia</i>	3
	<i>Moraxella osloensis</i>	1
	<i>Oligella urethralis</i>	2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
	<i>P. fluorescens</i> nebo <i>P. putida</i>	6
	<i>P. pictorum</i>	1
	<i>P. stutzeri</i>	1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11

10.2 Dva vzory identifikace bakterií podle Chakravorty a kol., 2010



Pozn.: (A) semispecifické Molecular Beacon (SMB); (B) použity konvenční specifické Molecular Beacon (MB)
(Upraveno podle Chakravorty a kol., 2010)

10.3 Bakteriální druhy použité ve studii Chakravorty a kol., 2010

Enterococcus spp. ~ *E. avium*, *E. faecium*, *E. faecalis* a *E. gallinarum*

D hodnota je vypočítána jako vzdálenost mezi T_M stanovenou pro jednotlivé druhy a získanou hodnotou.

Druh	D hodnota
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,65
<i>A. calcoaceticus</i>	0,67
<i>A. Iwoffii</i>	0,60
<i>Actinomyces meyeri</i>	0,47
<i>Aerococcus viridans</i>	0,60
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,60
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0,47
<i>Bacillus anthracis</i>	0,43
<i>B. cereus</i>	0,74
<i>B. subtilis</i>	0,18
<i>Bartonella henselae</i> / <i>Campylobacter jejuni</i>	0,37
<i>Bartonella quintana</i>	0,47
<i>Bifidobacterium breve</i>	0,33
<i>Bordetella holmesii</i> / <i>B. pertussis</i> / <i>B. parapertussis</i>	0,71
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0,17
<i>Brucella abortus</i>	0,47
<i>B. canis</i> / <i>B. melitensis</i> / <i>B. suis</i>	0,97
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,58
<i>Burkholderia mallei</i>	0,62
<i>Chlamydia psittaci</i>	2,04
<i>Ch. trachomatis</i>	0,37
<i>Citrobacter freundii</i>	0,62
<i>Clostridium botulinum</i>	0,76
<i>C. acetobutylicum</i>	0,17
<i>C. difficile</i>	0,74
<i>C. perfringens</i>	0,37
<i>C. septicum</i>	0,50
<i>C. tetani</i>	0,47

10.3 Bakteriální druhy použité ve studii Chakravorty a kol., 2010 - pokračování

Druh	D hodnota
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1,53
<i>C. diphtheriae</i>	0,78
<i>C. jeikeium</i>	0,78
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	0,82
<i>C. xerosis</i>	0,90
<i>Coxiella burnetti</i>	1,12
<i>Dermabacter hominis</i>	0,90
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	0,83
<i>Eikenella corrodens</i>	0,91
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,07
<i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Klebsiella oxytoca</i>	0,87
<i>Enterococcus</i> spp.	0,24
<i>Escherichia coli</i> / <i>Shigella</i> sp.	1,11
<i>E. coli</i> / <i>Shigella</i> sp.	1,00
<i>E. coli</i> / <i>Shigella</i> sp.	1,03
<i>E. coli</i> / <i>Shigella</i> sp.	0,98
<i>Exiguobacterium</i> sp.	0,68
<i>Francsella tularensis</i>	0,00
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	0,67
<i>Haemophilus aegyptus</i> / <i>Pasteurella multocida</i>	1,00
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	0,59
<i>H. ducreyi</i>	1,82
<i>H. influenzae</i>	0,89
<i>H. parahemolyticus</i>	0,37
<i>H. parainfluenzae</i>	0,97
<i>H. paraphrophilus</i>	0,83
<i>Hafnia alvei</i>	0,60
<i>Helicobacter pylori</i>	0,50
<i>Kingella kingae</i>	0,85
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,73
<i>Lactobacillus fermentas</i>	0,88
<i>Legionella pneumophilla</i>	0,75

10.3 Bakteriální druhy použité ve studii Chakravorty a kol., 2010 - pokračování

Druh	D hodnota
<i>Leptospira interrogans</i> / <i>L. kirschneri</i>	0,60
<i>L. biflexa</i>	0,33
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1,53
<i>Listeria geayi</i> / <i>L. monocytogenes</i>	1,49
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,67
<i>Morganella morganii</i>	0,52
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0,50
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,41
<i>N. meningitidis</i> / <i>N. lactamica</i>	1,00
<i>N. mucosa</i>	0,82
<i>Nocardia brasiliensis</i> / <i>N. farcinia</i> / <i>N. pseudobrasiliensis</i>	1,00
<i>Oligella urethralis</i>	2,03
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,00
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1,20
<i>Propionibacterium acnes</i>	0,85
<i>Proteus mirabilis</i>	0,80
<i>P. vulgaris</i>	0,97
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0,67
<i>P. rettgeri</i>	0,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,99
<i>Psychrobacter faecalis</i>	1,37
<i>Rhodococcus equi</i>	0,82
<i>Rickettsia prowazekii</i> / <i>R. rickettsii</i>	0,85
<i>Salmonella arizonae</i>	1,19
<i>S. enteritidis</i>	1,48
<i>S. paratyphi</i>	0,96
<i>S. typhi</i>	1,20
<i>Serratia marcescens</i>	1,14
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,97
<i>S. capitis</i> / <i>S. epidermidis</i>	1,08
<i>S. cohnii</i> / <i>S. haemolyticus</i>	0,83
<i>S. hominis</i>	0,82

10.3 Bakteriální druhy použité ve studii Chakravorty a kol., 2010 - pokračování

Druh	D hodnota
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0,83
<i>S. sciuri</i>	0,97
<i>S. simulans</i>	1,34
<i>S. warneri</i>	1,34
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,34
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1,42
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,02
<i>S. consetellatus</i>	0,76
<i>S. equi</i> / <i>S. mutans</i>	0,41
<i>S. dysgalactiae</i>	0,69
<i>Streptococcus. mitis</i> / <i>S. pneumoniae</i>	1,00
<i>S. pyogenes</i> / <i>S. uberis</i>	0,43
<i>Treponema denticola</i>	0,60
<i>T. palidum</i>	0,47
<i>Ureoplasma urealyticum</i>	1,03
<i>Vibrio alginolyticus</i> / <i>V. campbellii</i>	1,03
<i>V. cholerae</i>	0,71
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,46
<i>Y. pestis</i>	1,51

10.4 Druhy bakterií použité ve studii Yang a kol., 2009

Identifikace je umožněna pomocí rozdílných kódů, které byly vygenerované pro každý druh/kmen, na základě podobnosti křivek tání, s použitím primerů na hypervariabilní regiony V1, V3 a V6 16S rDNA genu.

	Druh/Kmen	Kód		
		V1	V3	V6
Non-BT related	<i>Acinetobacter</i> sp. strain ATCC 5459	a	b	a
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	b	d	a
	<i>Aerococcus viridans</i>	f	h	c
	<i>Bacteriodes fragilis</i>	a	a	e
	<i>Bordetella pertussis</i>	c	c	f
	<i>Bordetella parapertusis</i>	a	c	h
	<i>Campylobacter jejuni</i>	c	a	e
	<i>Clostridium difficile</i>	g	f	a
	<i>Clostridium perfringens</i>	b	d	d
	<i>Corynebacterium</i> sp.	c	c	e
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	g	c	a
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	f	a	b
	<i>Citrobacter freundii</i>	b	c	a
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	c	b	a
	<i>Enterobacter faecalis</i> ATCC 29212	i	i	a
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	i	i	h
	<i>Enterococcus faecium</i>	b	a	e
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25927	e	d	c
	<i>Helicobacter pylori</i>	g	b	a
	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49147	b	g	d
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	h	c	a
	<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33495	a	a	b
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7648	b	e	a
	<i>Micrococcus</i> sp. strain ATCC 14396	b	b	b
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	h	i	d
	<i>Mycobacterium kansasii</i>	i	c	a
<i>Mycobacterium goodii</i>	d	i	i	

10.4 Druhy bakterií použité ve studii Yang a kol., 2009 - pokračování

	Druh/Kmen		Kód		
			V1	V3	V6
Non-BT related	<i>Mycobacterium fortuitum</i>		a	i	b
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		b	d	g
	<i>Mycoplasma hominis</i>		a	b	e
	<i>Neisseria meningitis</i> ATCC 6250		d	f	c
	<i>Oligella urethralis</i>		b	a	i
	<i>Pasteurella multocida</i>		b	i	a
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145		b	b	c
	<i>Propionibacterium acnes</i>		e	i	e
	<i>Proteus mirabilis</i>		b	a	f
	<i>Proteus vulgaris</i>		c	a	i
	<i>Salmonella</i> sp. strain ATCC 31194		c	e	a
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8101		b	j	c
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		c	b	h
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228		a	a	h
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		g	i	i
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		h	i	h
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619		g	d	g
	<i>Streptococcus pyogenes</i>		b	e	b
	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813		b	e	d
	<i>Treponema pallidum</i>		f	b	e
<i>Streptococcus</i> sp. viridující ATCC 10566		c	e	f	
BT a příbuzné druhy	<i>Bacillus anthracis</i>		c	a	a
		3001	c	a	a
	<i>Bacillus cereus</i>		a	a	d
		BC 9634	a	a	d
		BC 12480	a	a	d
		BC 27877	a	a	d
		BC 7064	a	a	d
		BC B33	a	a	d
		BC 1410-1	a	a	d
BC 1410-2	a	a	d		

10.4 Druhy bakterií použité ve studii Yang a kol., 2009 - pokračování

	Druh/Kmen	Kód			
		V1	V3	V6	
BT a příbuzné druhy	<i>Bacillus cereus</i>	BC T	a	a	d
		BC 2599	a	a	d
		BC 2464	a	a	d
		BC 7687	a	a	d
		BC 10329	a	a	d
		BC 11143	a	a	d
		BC 11145	a	a	d
		BC 1414	a	a	d
		BC 7089	a	a	d
		BC 6464	a	a	d
		BC 6474	a	a	d
		BC 7004	a	a	d
		BC 10987	a	a	d
		BC 23674	a	a	d
		BC 9189	a	a	d
		BC 246	a	a	d
	BC 13472	a	a	d	
	<i>Bacillus subtilis</i>	110 NA	a	a	g
		SB168	a	a	g
		W168	a	a	g
		W23	a	a	g
		her 148	a	a	g
		T6	a	a	g
		ATCC 27505	a	a	g
		ATCC 15841	a	a	g
	<i>Coxiella burnetti</i>		d	b	g
		"9 mile"	d	b	g
	<i>Francisella philomiragia</i> GAO1-2810		a	g	g
<i>Francisella tularensis</i>	LVSB	b	h	g	
	Fran 0001	b	h	g	

10.4 Druhy bakterií použité ve studii Yang a kol., 2009 - pokračování

	Druh/Kmen		Kód		
			V1	V3	V6
BT a příbuzné druhy	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	PBA/+	a	g	c
		Schutze's group typ B, ATCC 6930	a	g	c
		Schutze's group II, ATCC 27802	a	g	c
		CDC P62, ATCC 29910	a	g	c
		Schutze's group III, ATCC 13980	a	g	c
		raffinosa-pozitivní, ATCC 4284	a	g	c
		ATCC 13979	a	g	c
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	serotyp 0:9	a	g	d
	<i>Yersinia pestis</i>	P14 ⁻	a	b	d
		1122	a	b	d

10.5 Druhy bakterií požití ve studii Chakravorty a kol., 2007

Druh	Číslo/TIGR CMR označení sekvence
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	AJ888984
<i>Actinomyces israelii</i>	X82450
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	X79225
<i>Aerococcus viridans</i>	AY707778
<i>Actinomyces meyeri</i>	X82451
<i>Burkholderia cepacia</i>	AB211325
<i>Burkholderia mallei</i>	BMAA_Bm16SC
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	NTBP01_Bp16SA
<i>Brucella melitensis</i>	NTBM01_Bm16SA
<i>Brucella suis</i>	GBR_Bs16SA
<i>Bordetella parapetrussis</i>	NTBP02_Bp16SA
<i>Borrelia burgdorferi</i> B31	GBB_Bb16SA
<i>Bacillus anthracis</i>	GBA_Ba16SA
<i>Bacillus cereus</i>	NTBC01_Bc16SA
<i>Bacillus subtilis</i>	NTBS01_Bs16SA
<i>Bacteriodes fragilis</i>	M11656
<i>Bordetella pertusis</i>	NTBP03_Bp16SA
<i>Clostridium botulinum</i>	AF105402
<i>Clostridium difficile</i>	AF072474
<i>Clostridium septicum</i>	U59278
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NTCA01_Ca16SA
<i>Clostridium perfringens</i>	NTCP03_Cp16SA
<i>Clostridium diptheriae</i>	NTCD01_Cd16SA
<i>Clostridium tetani</i>	NTCT02_Ct16SA
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	X84250
<i>Campylobacter jejuni</i>	NTCJ01_Cj16SA
<i>Chlamydia trachomatis</i>	NTCT01_16SrRNA-1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	NTCP05_Cp16SA
<i>Coxiella burnetti</i>	GCB_Cb16SA
<i>Enterococcus gallinarum</i>	AJ301833
<i>Enterococcus faecalis</i>	AJ291732
<i>Enterococcus faecium</i>	AJ291732

10.5 Druhy bakterií požití ve studii Chakravorty a kol., 2007 - pokračování

Druh	Číslo/TIGR CMR označení sekvence
<i>Enterobacter aerogenes</i>	AB004750
<i>Escherichia coli</i> BL21	AJ605115
<i>Escherichia coli</i> K12	NTEC01_16SrRNA-1
<i>Escherichia coli</i> O157H7	NTEC01_Ec16SA
<i>Fusobacterium sulci</i>	AJ006963
<i>Fusobacterium alocis</i>	AJ006962
<i>Fusobacterium equorum</i>	AJ295750
<i>Fusobacterium naviforme</i>	AJ006965
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	AJ810275 / NTFN01_Fn16SA
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	AJ810271
<i>Fusobacterium prausnitzii</i>	AJ413954
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	X74407
<i>Francisella tularensis</i>	AJ698865
<i>Haemophilus paraphrophilus</i>	AY365451
<i>Haemophilus parahaemoliticus</i>	AJ290758
<i>Haemophilus ducreyi</i>	AF525028 / NTHZD01_Hd16SA
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	AJ290755
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	AY365453
<i>Haemophilus influenzae</i>	AY613778 / GHLI_HlrrnA16S
<i>Helicobacter pylori</i>	NTHP01_Hp16SA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Y17657
<i>Listeria grayi</i>	X98526
<i>Listeria monocytogenes</i>	AJ535697
<i>Leptospira interrogans</i>	AM050580
<i>Legionella pneumophila</i>	NTLP02_NT02LP0369
<i>Moraxella catarrhalis</i>	U10876
<i>Mycobacterium avium</i>	AJ536037
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	AJ536036
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	AJ416915
<i>Mycobacterium goodii</i>	AJ581472
<i>Mycobacterium kansasii</i>	AJ536035
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	AF480604

10.5 Druhy bakterií požití ve studii Chakravorty a kol., 2007 - pokračování

Druh	Číslo/TIGR CMR označení sekvence
<i>Mycobacterium bovis</i>	NTMB01_Mb16SA
<i>Mycobacterium leprae</i>	NTML01_MI16SA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	GMT_Mt16SA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	NTMT02_NT02MT1437
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	AJ239304
<i>Neisseria mucosa</i>	AJ239282
<i>Neisseria lactamica</i>	AJ239313
<i>Neisseria meningitidis</i>	GNM_NMrrnaA16SA
<i>Nocardia brasiliensis</i>	AF430038
<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	X84855
<i>Ologella urethralis</i>	AY513496
<i>Proteus vulgaris</i>	X07652
<i>Proteus mirabilis</i>	AJ301682
<i>Peptostreptococcus micros</i>	AF542231
<i>Propionibacterium acnes</i>	NTPA02_NT02PA0587
<i>Pasteurella multocida</i>	NTPM01_Pm16SA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AY268175
<i>Rickettsia prowazekii</i>	NTRP01_Rp16SA
<i>Rickettsia rickettsii</i>	U11021
<i>Rhodococcus equi</i>	X80682
<i>Shigella dysenteriae</i>	X96966
<i>Shigella flexneri</i>	NTSF02_Sf16SD
<i>Salmonella paratyphi</i>	X80682
<i>Salmonella enteritica typhi</i>	NTST04_St16SA
<i>Salmonella typhimurium</i>	NTST01_St16SA
<i>Serratia marcescens</i>	AJ233431
<i>Streptococcus uberis</i>	U41048
<i>Streptococcus pyogenes</i>	NTSP03_Sp16SA
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	BSP_Sp16SA
<i>Streptococcus agalactiae</i>	GBS_Sa16SA
<i>Streptococcus mutans</i>	NTSM02_Sm16SA
<i>Streptococcus gordonii</i>	D38483

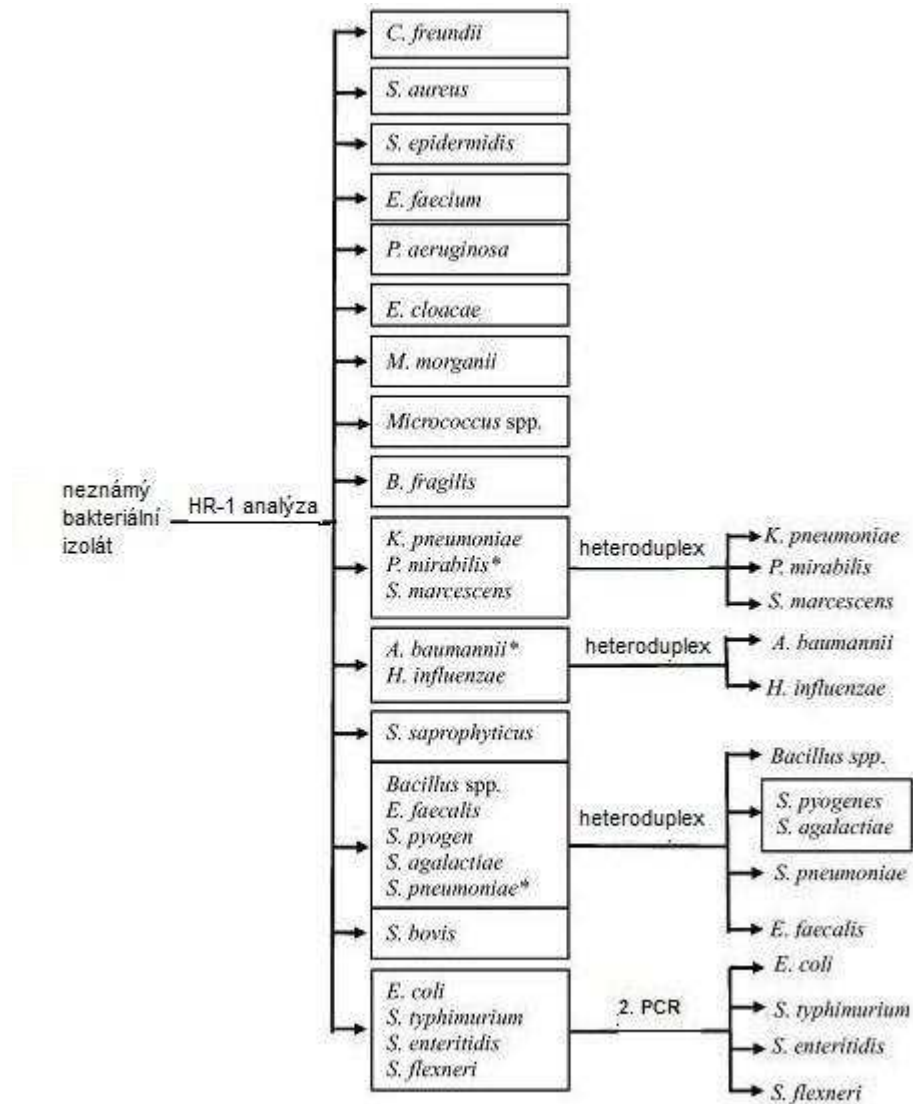
10.5 Druhy bakterií použité ve studii Chakravorty a kol., 2007 - pokračování

Druh	Číslo/TIGR CMR označení sekvence
<i>Streptococcus mitis</i>	GMI_Sm16SA
<i>Streptococcus salivarius</i>	AY188352
<i>Staphylococcus aureus</i>	SACOL_Sa16SA
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NTSE02_Se16SA
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	NTSS03_NT03SS0724
<i>Staphylococcus caprae</i>	AY346310
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	D83367
<i>Staphylococcus hominis</i>	AJ717375
<i>Staphylococcus intermedius</i>	D83369
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	AB009941
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	D83372
<i>Staphylococcus simulans</i>	D83373
<i>Staphylococcus warneri</i>	L37603
<i>Traponema pallidum</i>	GTP_Tp16SA
<i>Vibrio cholerae</i>	X87337
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Z75316
<i>Yersinia pestis</i>	NTYP02_Yp16SA

10.6 Druhy bakterií použité ve studii Cheng a kol., 2006

Druh	Počet kmenů
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
<i>Bacillus</i> sp.	1
<i>Bacteroides fragilis</i>	3
<i>Citrobacter freundii</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	3
<i>Enterococcus faecium</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Haemophilus influenzae</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Micrococcus</i> sp.	1
<i>Morganella morganii</i>	1
<i>Proteus mirabilis</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Salmonella enteritidis</i>	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	3
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Shigella flexneri</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1
<i>Streptococcus bovis</i>	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1

10.7 Postup práce pro rychlou detekci a identifikaci 25 klinicky důležitých bakteriálních druhů (Upraveno podle Cheng a kol., 2006)



10.8 Druhy kvasinek použité ve studii Bergman a kol., 2007

	Druh	Počet
Klinické izoláty	<i>Candida glabrata</i>	22
	<i>C. albicans</i>	20
	<i>C. parapsilosis</i>	19
	<i>C. krusei</i>	10
	<i>C. dubliniensis</i>	9
	<i>C. tropicalis</i>	7
	<i>C. lusitaniae</i>	5
	<i>C. guilliermondii</i>	2
	<i>C. norvegensis</i>	2
	<i>C. famata</i>	1
	<i>C. kefyr</i>	1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1
	Referenční kmeny	<i>Candida albicans</i> (ATCC 60193)
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750, CCUG 47037)		1
<i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)		1

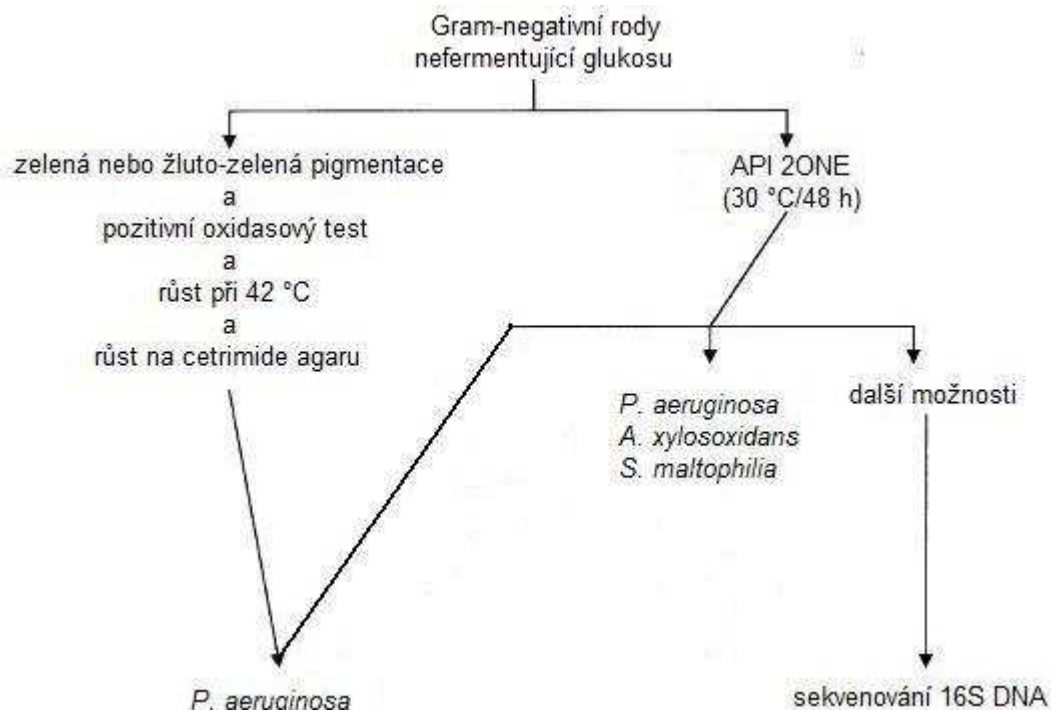
10.9 Bakteriální rody použité ve studii Mellmann a kol., 2008

Rod	Počet
<i>Achromobacter</i>	6
<i>Acidovorax</i>	7
<i>Acinetobacter</i>	24
<i>Alcaligenes</i>	2
<i>Alishewanella</i>	1
<i>Arsenophonus</i>	1
<i>Arthrobacter</i>	1
<i>Balneatrix</i>	1
<i>Bergeyella</i>	1
<i>Blastomonas</i>	2
<i>Brevundimonas</i>	6
<i>Burkholderia</i>	26
<i>Chryseobacterium</i>	2
<i>Comamonas</i>	5
<i>Delftia</i>	1
<i>Elizabethkingia</i>	2
<i>Empedobacter</i>	1
<i>Flavobacterium</i>	8
<i>Inquilinus</i>	1
<i>Malikia</i>	1
<i>Microbulbifer</i>	1
<i>Myroides</i>	2
<i>Novosphingobium</i>	4
<i>Ochrobactrum</i>	5
<i>Pandoraea</i>	4
<i>Pannonibacter</i>	2
<i>Pseudomonas</i>	86
<i>Ralstonia</i>	4
<i>Rhizobium</i>	3
<i>Shewenella</i>	6
<i>Sphingobacterium</i>	5
<i>Sphingobium</i>	3

10.9 Bakteriální rody použité ve studii Mellmann a kol., 2008

Rod	Počet
<i>Sphingomonas</i>	14
<i>Sphingopyxis</i>	2
<i>Stenotrophomonas</i>	5
<i>Terrimonas</i>	1
<i>Weeksella</i>	1
<i>Wolinella</i>	1

10.10 Schéma identifikace Gram-negativních rodů (Upraveno podle Ferroni a kol., 2002)



10.11 Kompletní seznam kmenů použitých ve studii

Šedě označené kmeny jsou kvasinky nebo nebyly odebrány od pacienta s cystickou fibrózou (CF) nebo chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN).

Krabička	Pozice	Diagnóza	Rod	Druh
CF1	01	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	02	E840	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF1	03	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF1	04	E840	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
CF1	05	E840	Kvasinky	
CF1	06	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	07	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF1	08	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	09	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF1	10	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	11	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF1	12	E840	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
CF1	13	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	14	E840	<i>Burkholderia</i>	sp.
CF1	15	E840	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF1	16	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	17	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	18	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	19	E840	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
CF1	20	E840	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF1	21	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	22	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF1	23	E840	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
CF1	24	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF1	25	E840	<i>Staphylococcus</i>	sp.

10.11 Kompletní seznam kmenů použitých ve studii - pokračování

Krabička	Pozice	Diagnóza	Rod	Druh
CF1	26	E840	<i>Streptococcus</i>	sp.
CF1	27	E840	<i>Acinetobacter</i>	sp.
CF1	28	E848	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	29	E848	Kvasinky	
CF1	30	E848	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
CF1	31	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	32	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	33	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	34	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF1	35	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF1	36	E849	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	37	E849	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
CF1	38	E849	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	39	E848	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF1	40	E848	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	41	E848	<i>Streptococcus</i>	sp. anhemolytický
CF1	42	E848	<i>Streptococcus</i>	sp. anhemolytický
CF1	43	E848	<i>Streptococcus</i>	sp. anhemolytický
CF1	44	E848	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF1	45	E848	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF1	46	E849	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF1	47	E849	<i>Klebsiella</i>	sp.
CF1	48	E849	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i> (viridující)
CF1	49	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	50	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	51	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	52	E840	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF1	53	J448	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>

10.11 Kompletní seznam kmenů použitých ve studii - pokračování

Krabička	Pozice	Diagnóza	Rod	Druh
CF1	54	J448	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	55	J448	<i>Klebsiella</i>	sp.
CF1	56	J448	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF1	57	J448	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	58	J448	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF1	59	J441	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>
CF1	60	J441	<i>Klebsiella</i>	sp.
CF1	61	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF1	62	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	63	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. anhemolytický
CF1	64	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. anhemolytický
CF1	65	E840	<i>Streptococcus</i>	sp.
CF1	66	J448	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	67	J448	<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>
CF1	68	J448	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF1	69	J448	<i>Streptococcus</i>	sp. anhemolytický
CF1	70	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. anhemolytický
CF1	71	J448	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
CF1	72	J448	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
CF1	73	J448	<i>Enterococcus</i>	sp.
CF1	74	E849	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>
CF1	75	E849	<i>Enterobacter</i>	<i>sakazakii</i>
CF1	76	E849	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF1	77	E849	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF1	78	E849	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	79	E849	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	80	J448	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF1	81	J448	neidentifikováno	

10.11 Kompletní seznam kmenů použitých ve studii - pokračování

Krabička	Pozice	Diagnóza	Rod	Druh
CF2	1	J448	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF2	2	E841	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF2	3	E841	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF2	4	E841	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF2	5	E841	<i>Streptococcus</i>	sp. anhemolytický
CF2	6	E841	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF2	7	E841	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF2	8	E841	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF2	9	E841	<i>Enterococcus</i>	sp.
CF2	10	E841	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF2	11	E841	<i>Streptococcus</i>	sp. anhemolytický
CF2	12	E841	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF2	13	E849	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF2	14	E849	<i>Streptococcus</i>	sp. anhemolytický
CF2	15	E849	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF2	16	E849	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF2	17	E849	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF2	18	E840	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
CF2	19	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. aAnhemolytický
CF2	20	E840	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF2	21	E848	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
CF2	22	E848	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF2	23	E848	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF2	24	E848	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF2	25	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF2	26	J441	<i>Streptococcus</i>	sp.
CF2	27	J441	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF2	28	J441	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>

10.11 Kompletní seznam kmenů použitých ve studii - pokračování

Krabička	Pozice	Diagnóza	Rod	Druh
CF2	29	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF2	30	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF2	31	J441	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF2	32	J441	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF2	33	E840	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
CF2	34	E840	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
CF2	35	E840	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF2	36	E848	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF2	37	J448	<i>Achromobacter</i>	sp.
CF2	38	J448	<i>Acinetobacter</i>	sp.
CF2	39	J448	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF2	40	J448	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF2	41	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF2	42	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF2	43	E840	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF2	44	J441	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF2	45	J441	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
CF2	46	E849	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF2	47	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF2	48	J441	<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i>
CF2	49	E849	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF2	50	J441	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF2	51	J441	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF2	52	J441	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>
CF2	53	J441	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF2	54	J441	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF2	55	J441	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF2	56	J441	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>

10.11 Kompletní seznam kmenů použitých ve studii - pokračování

Krabička	Pozice	Diagnóza	Rod	Druh
CF2	57	E840	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF2	58	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF2	59	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF2	60	E840	<i>Enterococcus</i>	sp.
CF2	61	J441	<i>Enterobacteriaceae</i>	
CF2	62	J441	<i>Streptococcus</i>	<i>sp. viridující</i>
CF2	63	E840	<i>Enterobacter</i>	<i>sakazakii</i>
CF2	64	J441	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>
CF2	65	J441	<i>Streptococcus</i>	sp.
CF2	66	J441	<i>Streptococcus</i>	sp.
CF2	67	J441	<i>Enterobacteriaceae</i>	
CF2	68	J441	<i>Streptococcus</i>	<i>sp. viridující</i>
CF2	69	E848	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF2	70	E848	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF2	71	J441	<i>Escherichia</i>	<i>coli var. Haemol</i>
CF2	72	J441	<i>Streptococcus</i>	<i>sp. viridující</i>
CF2	73	J441	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF2	74	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF2	75	E840	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF2	76	E840	<i>Streptococcus</i>	<i>sp. viridující</i>
CF2	77	E840	<i>Enterobacter</i>	sp.
CF2	78	E849	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF2	79	E849	<i>Streptococcus</i>	<i>sp. viridující</i>
CF2	80	E849	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF2	81	J448	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF3	1	E840	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF3	2	J441	<i>Streptococcus</i>	<i>sp. viridující</i>
CF3	3	J441	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>

10.11 Kompletní seznam kmenů použitých ve studii - pokračování

Krabička	Pozice	Diagnóza	Rod	Druh
CF3	4	J441	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	5	E848	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF3	6	J448	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF3	7	J448	<i>Burkholderia</i>	sp.
CF3	8	J448	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF3	9	J448	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF3	10	J448	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF3	11	J449	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>
CF3	12	J449	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
CF3	13	J448	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF3	14	J449	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
CF3	15	J450	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF3	16	J441	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	17	J441	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	18	J448	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF3	19	J448	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	20	J441	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	21	J441	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	22	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF3	23	E840	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF3	24	J448	<i>Enterobacteriaceae</i>	
CF3	25	J448	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF3	26	J441	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	27	J441	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF3	28	E840	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF3	29	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF3	30	E840	<i>Achromobacter</i>	sp.
CF3	31	J441	<i>Enterococcus</i>	sp.

10.11 Kompletní seznam kmenů použitých ve studii - pokračování

Krabička	Pozice	Diagnóza	Rod	Druh
CF3	32	J448	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF3	33	J448	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	34	E840	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF3	35	J441	<i>Acinetobacter</i>	sp.
CF3	36	E849	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	37	E840	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF3	38	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF3	39	J448	<i>Acinetobacter</i>	sp.
CF3	40	J448	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF3	41	J441	<i>Streptococcus</i>	<i>sp. viridující</i>
CF3	42	E849	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
CF3	43	E849	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
CF3	44	E849	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
CF3	45	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF3	46	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF3	47	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF3	48	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF3	49	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF3	50	E840	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	51	J209	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>
CF3	52	J441	<i>Streptococcus</i>	sp. anhemolytický
CF3	53	J441	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF3	54	J441	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	55	E848	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF3	56	E848	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF3	57	J448	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF3	58	J448	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>
CF3	59	E840	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>

10.11 Kompletní seznam kmenů použitých ve studii - pokračování

Krabička	Pozice	Diagnóza	Rod	Druh
CF3	60	N111	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF3	61	E849	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF3	62	E849	<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>
CF3	63	E849	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>
CF3	64	E849	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF3	65	E849	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF3	66	J448	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF3	67	E849	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF3	68	J180	<i>Enterobacter</i>	sp.
CF3	69	E840	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF3	70	E840	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF3	71	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF3	72	J449	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>
CF3	73	J449	<i>Enterobacteriaceae</i>	
CF3	74	J449	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF3	75	J449	<i>Enterobacteriaceae</i>	
CF3	76	J448	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF3	77	E840	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF3	78	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF3	79	E840	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
CF3	80	J448	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF3	81	J448	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF4	1	J448	<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>
CF4	2	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF4	3	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF4	4	?	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>
CF4	5	J448	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF4	6	J449	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující

10.11 Kompletní seznam kmenů použitých ve studii - pokračování

Krabička	Pozice	Diagnóza	Rod	Druh
CF4	7	J448	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF4	8	J448	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF4	9	J449	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF4	10	J448	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF4	11	E849	<i>Staphylococcus</i>	sp.
CF4	12	E849	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF4	13	J448	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF4	14	E841	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF4	15	J441	<i>Klebsiella</i>	sp.
CF4	16	J442	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF5	17	J443	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
CF4	18	J448	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF4	19	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aureus</i>
CF4	20	E840	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF4	21	J441	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF4	22	J441	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF4	23	E849	<i>Streptococcus</i>	sp. viridující
CF4	24	E849	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>
CF4	25	J448	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
CF4	26	J448	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
CF4	27	E840	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
CF4	28	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF4	29	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF4	30	E840	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
CF4	31	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF4	32	E840	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF4	33	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF4	34	E849	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>

10.11 Kompletní seznam kmenů použitých ve studii - pokračování

Krabička	Pozice	Diagnóza	Rod	Druh
CF4	35	E840	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
CF4	36	E840	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF4	37	E840	<i>Pseudomonas</i>	sp.
CF4	38	E840	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>