



Fakulta zemědělská  
a technologická  
Faculty of Agriculture  
and Technology

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra genetiky a biotechnologií

## Diplomová práce

Molekulární detekce střevních parazitů u laboratorních  
hlodavců

Autorka práce: Bc. Petra Fürstová

Vedoucí práce: Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.

České Budějovice  
2024

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne .....

.....  
Podpis

## Abstrakt

Diplomová práce na téma „Molekulární detekce střevních parazitů u laboratorních hlodavců“ se zaměřuje na problematiku molekulární detekce pomocí real-time PCR u laboratorních hlodavců s využitím primerů pro TaqMan real-time PCR. Navržené primery byly verifikovány na 22 vzorcích bukálních stěrů, biopsií ze střevní tkáně a exkrementů. Specifická byla ověřena na 9 příbuzných střevních parazitech. Také bylo provedeno stanovení detekčních limitů reakčních směsí. Detekční limit pro reakční směs pro *Spironucleus muris* byl stanoven na  $3,3 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ l, pro *Trichomonas muris* na  $9,4 \times 10^{-8}$  ng/ $\mu$ l a pro *Giardia muris* na  $1,66 \times 10^{-6}$  ng/ $\mu$ l. Mezi laboratorními hlodavci existuje mnoho onemocnění a přítomnost původců těchto onemocnění je potřeba detekovat. Mezi nejcitlivější detekční metody patří právě molekulární detekce. V dnešní době je stále k dispozici pouze málo navržených esejí pro detekci střevních parazitů, mezi které se řadí například *Spironucleus muris*, *Trichomonas muris* a v neposlední řadě *Giardia muris*. Potřeba detekovat tyto parazity vzrostla v důsledku stoupající poptávky po SPF (specified-pathogen free) laboratorních hlodavcích pro experimentální potřeby. Často se využívají jako indikátor selhání mikroizolační techniky. Střevní paraziti mohou také způsobovat velmi nepříjemná onemocnění, které je potřeba léčit. Cíle práce byly splněny. Optimalizované metody jsou vhodné pro použití k detekci *Spironucleus muris*, *Trichomonas muris* a *Giardia muris*. Výsledky diplomové práce mohou sloužit jako informační zdroj a mohou být využity k dalším výzkumným účelům.

**Klíčová slova:** Molekulární detekce; Real-time PCR; TaqMan; Střevní paraziti

## **Abstract**

The master's thesis „Molecular detection of intestinal parasites in laboratory rodents“ focuses on the issue of molecular detection by real-time PCR in laboratory rodents using primers for TaqMan real-time PCR. The designed primers were verified on 22 samples of buccal swabs, biopsies from intestinal tissue, and excrement. Specificity was verified on 9 related intestinal parasites. The detection limits of the reaction mixtures were also determined. The detection limit of the reaction mixture for *Spironucleus muris* was set at  $3.3 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ l, for *Tritrichomonas muris* at  $9.4 \times 10^{-8}$  ng/ $\mu$ l and for *Giardia muris* at  $1.66 \times 10^{-6}$  ng/ $\mu$ l. Many disease agents exist among laboratory rodents. The presence of these agents needs to be detected. Molecular detection is one of the most sensitive detection methods. Nowadays, only a few designed essays are available for detection of intestinal parasites, which include *Spironucleus muris*, *Tritrichomonas muris* and, last but not least, *Giardia muris*. The necessity to detect these parasites has increased due to the demand for SPF (specified-pathogen free) laboratory rodents for experimental purposes. The intestinal parasites are often used as an indicator of the failure of micro-isolation technology. Also, intestinal parasites can cause very unpleasant diseases that need to be treated. The aims has been met. The optimized methods are suitable for use in the detection of *Spironucleus muris*, *Tritrichomonas muris* and *Giardia muris*. The results of the thesis can serve as an information source and can be used for other investigative purposes.

**Keywords:** Molecular detection; Real-time PCR; TaqMan; Intestinal parasites

## **Poděkování**

Velké poděkování patří vedoucí práce Ing. Dagmar Stehlíkové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, cenné rady, ochotu a trpělivost. Poděkování patří také mé rodině a přátelům za podporu po celou dobu studia.

## Obsah

Úvod.....	8
1 Paraziti ( <i>Spironucleus muris</i> , <i>Tritrichomonas muris</i> a <i>Giardia muris</i> ) .....	10
1.1 Klasifikace.....	10
1.2 Morfologie .....	12
1.3 Virulence a patogenita.....	13
1.4 Epidemiologie .....	14
1.5 Onemocnění .....	16
1.6 Léčba.....	17
2 Metody detekce .....	18
2.1 Historie.....	18
2.2 Kultivace .....	19
2.3 Mikroskopie .....	20
2.4 Sérologie .....	21
2.5 Izolace DNA.....	22
2.5.1 Základní kroky .....	22
2.5.2 Druhy izolace DNA.....	23
2.6 PCR.....	25
2.6.1 Modifikace PCR.....	26
2.7 Real-time PCR .....	27
2.8 Klonování.....	31
2.9 Elektroforéza .....	33
2.10 Budoucnost.....	34
3 Cíl práce a výzkumné otázky .....	35
3.1 Cíl práce .....	35
3.2 Výzkumné otázky.....	35

4	Materiál a metody .....	36
4.1	Izolace DNA.....	36
4.1.1	Příprava vzorku pro izolaci DNA a lyze buněk .....	36
4.1.2	Adsorpce DNA na membránu, promývání a eluce .....	37
4.2	TaqMan Real-time PCR.....	37
4.3	Klonování.....	40
4.3.1	Hot start PCR .....	40
4.3.2	Vizualizace fragmentů DNA – Elektroforéza .....	41
4.3.3	Přečištění PCR produktu z gelu .....	42
4.3.4	Klonování TOPO .....	42
5	Výsledky .....	46
5.1	Klonování – standardy pro real-time PCR.....	46
5.2	Real-time PCR – <i>Spironucleus muris</i> .....	48
5.3	Real-time PCR – <i>Tritrichomonas muris</i> .....	51
5.4	Real-time PCR – <i>Giardia muris</i> .....	53
5.5	Verifikace real-time PCR a porovnání druhů biologických materiálů.....	56
6	Diskuse.....	58
	Závěr .....	62
	Seznam použité literatury.....	63
	Seznam obrázků .....	71
	Seznam tabulek .....	72
	Seznam použitých zkratk.....	73

---

## Úvod

Střevní parazité laboratorních hlodavců dokážou způsobit velmi nepříjemná onemocnění jako je spironukleóza způsobená prvokem *Spironucleus muris*, giardióza způsobená prvokem *Giardia muris* a trichomoniáza způsobená prvokem *Tritrichomonas muris* i dalšími z řádu *Trichomonadida*. Vybraní střevní parazité (*S. muris*, *T. muris* a *G. muris*) se řadí mezi eukaryotické jednobuněčné bičíkaté prvoky. Jedním z klinických projevů těchto onemocnění je průjem, který může vést až k dehydrataci, rozvrácení vnitřního prostředí a může způsobit až úhyn laboratorních hlodavců. Mezi zkoumané laboratorní hlodavce patří myši, krysy a křečci. Právě pro nasazení vhodné léčby je potřeba správná a včasná detekce střevních parazitů. Důležité je také odlišení od příbuzných druhů, jelikož se může u jednotlivých druhů léčba výrazně lišit.

Mikroskopie a sérologie nepatří mezi nejvhodnější metody k detekci střevních parazitů. Mikroskopická detekce parazitů navíc vyžaduje velice zkušeného laboranta a nejedná se o moc citlivou metodu. Sérologické metody byly a stále jsou velice využívané k detekci střevních parazitů, ovšem není to tak citlivá metoda a občas dochází k falešné pozitivitě. Metoda real-time PCR (polymerázová řetězová reakce) je v dnešní době hojně využívanou metodou pro detekci mnoha patogenů. Real-time PCR je modifikací PCR, která využívá speciální termocycler, který zaznamenává průběh reakce po každém cyklu. Od toho je odvozen název real-time PCR, tedy monitorování amplifikace v reálném čase. Od klasické PCR se liší hlavně v možnosti kvantifikace amplifikované DNA. Nejčastější využití této modifikace PCR je kvantifikace genové exprese, potravinářství, detekce GMO (tj. geneticky modifikovaného organismu) a medicínská diagnostika. Pod medicínskou diagnostiku spadá právě detekce infekčních nemocí a rakovinových buněk.

Hlavním cílem této diplomové práce je optimalizace metody real-time PCR, nalezení specifických primerů a sond pro detekci střevních parazitů, kterými jsou *Spironucleus muris*, *Tritrichomonas muris* a *Giardia muris*. Dalšími cíli jsou verifikace na vzorcích bukalních stěrů, biopsií ze střevní tkáně a exkrementů, stanovení specifity real-time PCR a stanovení detekčních limitů. Posledním cílem je porovnání vhodnosti jednotlivých typů biologických materiálů k analýze metodou real-time PCR.



---

Po optimalizaci bude možné metody využít pro detekci tří střevních parazitů – *S. muris*, *T. muris* a *G. muris*.

---

# 1 Paraziti (*Spironucleus muris*, *Tritrichomonas muris* a *Giardia muris*)

## 1.1 Klasifikace

*Spironucleus muris* je eukaryotický organismus. Jedná se o bičíkatého prvoka z říše *Excavata*, kmene *Metamonada*, z řádu *Diplomonadida*, z rodu *Hexamitidae*. Způsobuje onemocnění zvané spironukleóza. Kromě *S. muris* existují např. *S. barkhanus*, *S. columbae*, *S. meleagridis*, *S. salmonicida* a *S. salmonis*. *S. muris* byl dříve označován jako *Hexamita muris*. V polovině 80. let 20. století byly provedeny průzkumy, které ukázaly, že míra prevalence mezi domácími myšmi kmeny přesáhla 60 % (Fox et al., 2002; Burr et al., 2012; Greaves, 2012; Whary et al., 2015; Voros et al., 2021). Tato prevalence byla vyšší než prevalence zjištěná u volně žijících hlodavců v jiné studii. Nižší senzitivita dříve používaných diagnostických technik mohla podhodnocovat skutečnou prevalenci. Současná prevalence *S. muris* stále není známa (Voros et al., 2021). *S. muris* může být vizualizován pomocí Periodic Acid-Schiff (PAS) barvení. Diagnostika je založena na identifikaci trofozoitů (tj. pohyblivých vegetativních stádií parazitů v hostiteli) ve střevním traktu. V dnešní době je také hojně využívána detekce založená na PCR (Fox et al., 2002; Verweij, 2014; Whary et al., 2015, Voros et al., 2021). *S. muris* se nejvíce vyskytuje v čerstvém střevním obsahu a exkrementech. Exkrementy, případně střevní obsah, mohou být zachovány v octanu sodném a formalínu. Následně jsou cysty obarveny např. Gomoriho trichromem (Baker, 2006; Brown a Donnelly, 2012; Voros et al., 2021).

*Tritrichomonas muris* je eukaryotický nepatogenní prvok. *T. muris* patří do říše *Excavata*, kmene *Parabasalia*, řádu *Trichomonadida* a rodu *Tritrichomonadidae* (Fox et al., 2002; Baker, 2007; Whary et al., 2015; Da Costa et al., 2019). Jména *Trichomonas cricetus* a *T. criceti* byly dříve používány k popisu tritrichomonády nalezené u křečků, dnes je označována jako *T. muris*. Do řádu *Trichomonadida* patří *T. augusta*, *T. foetus*, *T. musculus*, *T. wenyoni*, *T. minuta*, *Trichomonas vaginalis*, *Tetratrichomonas microti* a *Pentatrichomonas hominis*. Termín trichomonády je nesprávný název pro řád, protože se původně předpokládalo, že tato skupina organismů má tři bičíky, zatímco ve skutečnosti mají jednotlivé druhy tři až pět bičíků. *Trichomonas* spp. mají ve skutečnosti čtyři bičíky, zatímco

---

*Tritrichomonas* spp. mají tři bičíky (Burr et al., 2012). *T. muris* je blízce příbuzný s *T. foetus*, patogenem, o kterém je známo, že infikuje reprodukční orgány skotu. *T. muris* se vyskytuje ve slepém, tlustém a tenkém střevě myši, potkanů a křečků. *T. muris* lze detekovat mikroskopicky nebo pomocí PCR. Pseudocysty lze nalézt mikroskopicky po provedení flotace stolice a za použití Lugolova jódového barvení nebo za použití trichromu (Fox et al., 2002; Baker, 2007; Burr et al., 2012; Whary et al., 2015; Al-Aboody et al., 2016; Zarei et al., 2018; Da Costa et al., 2019).

*Giardia muris* patří do říše *Excavata*, kmene *Metamonada*, řádu *Diplomonadida*, rodu *Hexamitidae*. Druh *Giardia* spp. zahrnuje eukaryotické bičíkaté jednobuněčné parazity, kteří infikují mnoho zvířat. *G. muris* je prvok, který neinvazivně kolonizuje střevní trakt a způsobuje průjemová onemocnění potkanů, myši a křečků. Nejspíše nedochází k přenosu *G. muris* z myši a křečků na krysy. Ovšem byla prokázána křížová infekce mezi myšmi a křečky po experimentální inokulaci organismů, zatímco potkani byli rezistentní vůči izolátům z myši a křečků (Van Keulen et al., 2002; Baker, 2006; Greaves, 2012; Xu et al., 2020; Jothikumar et al., 2021). *G. muris* byla dříve označována jako *Lambliia muris*. Celkem je akceptováno osm druhů *Giardia* spp. Patří mezi ně: *G. duodenalis* (synonymum *G. intestinalis* a *G. lamblia*), která infikuje lidi a zvířata, *G. agilis*, *G. ardeae*, *G. psittaci*, *G. muris*, *G. microti*, *G. peramelis* a *G. cricetarum*, které infikují nehumánní hostitele včetně obojživelníků, ptáků, hlodavců a vačnatců. *G. muris* můžeme detekovat pomocí světelné mikroskopie. Ovšem mikroskopická analýza environmentálních a klinických vzorků vyžaduje velké množství dovedností a zkušeností a není účinná pro identifikaci druhů. Cystická forma se vyskytuje ve fekálních nátěrech obarvených Lugolovým jódem, který barví vnitřní struktury, nebo v tkáňových řezech tlustého střeva obarvených hematoxylin-eosinem. Identifikace cyst pomocí flotace centrifugací se síranem zinečnatým zůstává standardem pro diagnostiku *G. muris*. *Giardia* spp. může být detekována pomocí testu SNAP Ag (tj. test založený na detekci antigenu) (Baker, 2006; Brown a Donnelly, 2012; Burr et al., 2012; Greaves, 2012; Whary et al., 2015; Ryan a Zahedi, 2019; Jothikumar et al., 2021). Testy PCR byly vyvinuty především pro zjišťování epidemiologie *Giardia duodenalis*, jediného druhu rodu *Giardia*, který má zoonotický potenciál (Cacció et al., 2010). Dříve navržené reakce nebyly navrženy tak, aby potvrdily rozdíly na úrovni druhů (kvůli nedostatku genetické variability mezi druhy). Infekce může

---

být také detekována sérologicky. qPCR (tj. quantitative PCR) je nejslibnější metodou detekce *Giardia* spp. (Whary et al., 2015; Jothikumar et al., 2021).

## 1.2 Morfologie

*S. muris* je malý, protáhlý, oboustranně symetrický bičíkatý parazit hruškovitého tvaru s rozměry 7–9×2–3 μm. *S. muris* má dvě jádra umístěná v předním segmentu a šest dlouhých bičíků. Dva další bičíky se táhnou dozadu rovnoběžně se dvěma krátkými axostyly (Fox et al., 2002; Baker, 2006; Burr et al., 2012; Whary et al., 2015). *S. muris* se pohybuje torpédovitě. *S. muris* se rozmnožuje nepohlavně. Při binárním dělení organismu dochází k produkci vejčitých cyst o velikosti 7,4×4,0 μm. Cysty obsahují až čtyři jádra. Trofozoiti *S. muris* jsou na rozdíl od *G. muris* a *T. muris* menší, pohybují se rychleji a postrádají přední sací disk (Fox et al., 2002; Baker, 2006; Burr et al., 2012; Whary et al., 2015). Velikost genomu je přibližně 14,7 Mbp a skládá se z devíti chromozomů (Xu et al., 2022).

*T. muris* má tři přední bičíky a jeden dlouhý vlečný bičík s undulující membránou, srpkovitou strukturu na předním okraji těla zvanou pelta, axostyl a jedno jádro. *T. muris* neencystují, ale tvoří pseudocysty, ve které se transformují v případě nepříznivých podmínek. Tyto struktury jsou méně pohyblivé formy organismu s internalizovanými bičíky. Pseudocysty *T. muris* postrádají pravou stěnu. Pseudocysty nakonec excystují a produkují pohyblivé trofozoity. Trofozoiti mají rozměry 16–26×10–14 μm. *T. muris* se rozmnožuje nepohlavně – binárním dělením (Baker, 2007; Burr et al., 2012; Zarei et al., 2018). U *Tritrichomonas* spp. nalezneme repetice a transpozibilní elementy, které tvoří asi dvě třetiny 160Mbp genomu, což odráží nedávnou masivní expanzi genomu. Genom je rozdělen do šesti chromozomů (Carlton et al., 2007).

*Giardia* spp. nalezené u křečků jsou morfologicky nerozeznatelné od těch, které byly nalezeny u myší. *G. muris* se rozmnožuje nepohlavně binárním dělením a vyskytuje se ve dvou fázích životního cyklu. Trofozoiti jsou hruškovitého tvaru, oboustranně symetrickí a jsou velcí 7-13 μm x 5-10 μm. Mezi charakteristické znaky patří sací disk, dvě jádra a střední těleso ve tvaru „drápu“. Zdá se, že střední tělísko funguje jako úložiště cytoskeletálních elementů. *G. muris* má čtyři páry bičíků, které jsou zodpovědné za pohyblivost organismu. Tyto páry bičíků jsou klasifikovány jako přední, zadní, ventrální a kaudální. Ventrální adhezivní disk připomíná přísavku, kde překrývající se mikrotubuly v cytoplazmě tvoří tvar čísla 6. Adhezivní disk

---

usnadňuje přilnutí prvoka ke střevnímu povrchu. Trofozoity lze snadno rozpoznat podle jejich charakteristických valivých pohybů. Cysty jsou elipsoidní a mohou mít až dvě střední tělíška a čtyři jádra a měří 8–11×7–19 μm. Cysty nemají adhezivní disk ani vnější bičíky. Cysty také postrádají buněčný aparát, jako jsou mitochondrie, Golgiho aparát, lysozomy a endoplazmatické retikulum. Cysty vyžadují vlhké podmínky, aby přežily po dobu týdnů až měsíců (Baker, 2006; Burr et al., 2012; Whary et al., 2015). Analýza malé podjednotky (SS) rDNA a její srovnání s jinými organismy naznačují, že *Giardia* spp. patří mezi nejprimitivnější eukaryotické organismy, u kterých byly dosud studované buňky. *G. duodenalis*, *G. muris* a *G. ardeae* se od sebe výrazně liší ve svých molekulárních karyotypech, i když *G. muris* a *G. ardeae* jsou morfologicky navzájem poměrně podobné (Van Keulen et al., 2002). Studie Van Keulena et al. (2002) byla provedena pro srovnání rDNA *G. muris*, *G. ardeae* a *G. duodenalis*. *G. muris* excystuje ve dvanáctníku a vytváří dva trofozoity (Burr et al., 2012). Genom *G. muris* má velikost 9,8 Mbp, což je výrazně méně než genom *G. intestinalis* (12,6 Mbp). Většina genomu (9,0 Mbp, 92 %) se nachází na pěti kontinuích (>1 Mbp). Žádný z nich není ukončen telomerickými repeticemi, ale ze zbývajících krátkých kontinuí (<30 kbp) je deset ukončeno telomerickými repeticemi (TAGGG), což naznačuje, že představují koncové body pěti chromozomů (Xu et al., 2020).

### 1.3 Virulence a patogenita

Mezi hostitele *S. muris* patří krysy, myši, křečci a nejspíše i další hlodavci. Infekce *S. muris* je u imunokompetentních myší obvykle asymptomatická, ale některé inbrední kmeny myší jsou na infekci náchylnější. *S. muris* je také více patogenní pro mladé, stresované nebo imunokompromitované myši. Krysy a křečci jsou většinou odolní vůči infekci. U křečka *S. muris* nezpůsobuje onemocnění vůbec. Myši ve věku 3-6 týdnů jsou vystaveny výrazně vyššímu riziku klinicky zjevné infekce. Životní cyklus *S. muris* je přímý a je podobný *G. muris*. Trofozoiti žijí v duodenum a slepém střevě, kde kolonizují povrch sliznice, zejména Lieberkühnovy krypty. Cysty se uvolňují do exkrementů a k přenosu dochází fekálně-orální cestou (Fox et al., 2002; Baker, 2006; Baker, 2007; Brown a Donnelly, 2012; Burr et al., 2012; Greaves, 2012; Whary et al., 2015; Voros et al., 2021).

*T. muris* patří mezi střevní komenzální organismy. Má velmi nízkou infekční dávku (pět pseudocyst) u myší. Proto se využívá jako indikátor selhání mikroizolační

---

techniky u myši SPF, kde se pravidelně provádí testy na různé druhy patogenů uvedených v certifikátu ke zvířatům. Při proteomické analýze střevní tkáně odebrané myším infikovaným *T. muris* byla odhalena rozdílná exprimace několika proteinů, což naznačuje, že infekce *T. muris* může vyvolat imunitní odpověď a zánětlivou reakci (Baker, 2007; Kashiwagi et al., 2009; Burr et al., 2012; Da Costa et al., 2019).

*G. muris* postihuje širokou škálu hostitelů po celém světě, včetně laboratorních hlodavců, primátů a člověka. K přenosu dochází fekálně-orální cestou (Baker, 2007; Burr et al., 2012; Whary et al., 2015; Garcia et al., 2018). Cysty představují infekční stádium organismu. Infekční dávka se pohybuje od 5 do 20 cyst. *G. intestinalis* byla rozsáhle prozkoumána na genomické a buněčně-biologické úrovni. Bylo zjištěno, že genom *G. muris* kóduje mnoho stejných faktorů virulence jako *G. intestinalis*. Životní cyklus a infekční proces *G. muris* a *G. intestinalis* je velmi podobný. Životní cyklus *G. muris* je přímý. Trofozoiti žijí v tenkém střevě, kde kolonizují slizniční povrch proximálního tenkého střeva a přilnou k cylindrickým buňkám v blízkosti bází střevních klků. Trofozoiti se mohou přeměnit v cysty za nepříznivých podmínek. (Baker, 2006; Burr et al., 2012; Xu et al., 2020).

#### 1.4 Epidemiologie

Cysty *S. muris* mohou být přítomny v kontaminované vodě a krmivu. Inkubační doba je většinou 2–3 dny, ale může trvat až 6 dní. K maximálnímu vylučování cyst dochází po 1–2 týdnech. K přenosu dochází fekálně-orální cestou. *S. muris* se přenáší mezi křečky, myši a potkany. Příznaky infekce zahrnují vodnatý, červenohnědý, plyný střevní obsah. Je však nezbytné vyloučit primární infekci nebo koinfekci jinými patogeny (Fox et al., 2002; Baker, 2006; Burr et al., 2012; Greaves, 2012; Whary et al., 2015; Garcia et al., 2018; Voros et al., 2021). Prevence onemocnění způsobené *S. muris* spočívá v oddělení infikovaných jedinců. Je totiž známo, že mezi těmito druhy dochází ke křížové kontaminaci (Burr et al., 2012). Dle Bakera (2006) je prevence onemocnění založena na přísném dodržování správné hygieny a snížení stresu. Dekontaminace pasterizací je většinou účinnější než použití dezinfekčních prostředků (Burr et al., 2012).

*T. muris* je poměrně rozšířený střevní prvok u myši. Může se přenášet z křečka na myš a není považována za patogenní. *T. muris* je často detekována ve střevě jako náhodný nález při vyšetření na přítomnost střevního onemocnění. Tento organismus se nachází nejvíce v lumen cecal, ale protože je považován za nepatogenní, infekci

---

nedoprovází většinou žádná patologie. *T. muris* ovšem může zvyšovat náchylnost ke střevnímu onemocnění a může zhoršovat průběh infekce. Dochází k interakci ve střevě, která mění homeostázu imunitních buněk. K fekálně-orálnímu přenosu dochází požitím buď pseudocysty nebo trofozoitního stádia tohoto parazita, které jsou vylučovány ve stolici (Fox et al., 2002; Baker, 2007; Burr et al., 2012; Whary et al., 2015; Escalante et al., 2016; Garcia et al., 2018; Zarei et al., 2018; Da Costa et al., 2019). Screening *T. muris* není v zařízeních pro zvířata standardem, proto současná prevalence *T. muris* u laboratorních myší není známa (Escalante et al., 2016; Da Costa et al., 2019). Inkubační doba je 10 dní (Baker, 2007).

*G. muris* je oportunní patogen dvanáctníku a způsobuje onemocnění zvané giardióza. Inkubační doba je 3–5 dní a vrchol vylučování cyst nastává po 7–14 dnech (Burr et al., 2012; Whary et al., 2015). *G. muris* má jednoduchý životní cyklus, který začíná perorálním požitím infekčních cyst – kontaminovaným jídlem nebo vodou. Jakmile projde žaludkem, probíhá excystace s uvolňováním bičíkatých trofozoitů, které rychle kolonizují sliznici tenkého střeva, aniž by ji napadly. Po příslušných hostitelských signálech, jako jsou žlučové soli a vyšší pH, se trofozoity encystují a vytvoří tak infekční cystové stádium, které je vylučováno výkaly (Baker, 2006; Dreesen et al., 2014; Garcia et al., 2018). V současné době není prevalence infekce u laboratorních potkanů a myší známa (Baker, 2006; Whary et al., 2015). Zatímco prevalence *G. muris* u křečka je velmi vysoká, pravděpodobnost, že křeček má klinické příznaky nebo patologické léze, je velmi nízká. Snížené pH může být zodpovědné za migraci *G. muris* do neobvyklého místa v žaludeční sliznici. Infekce jsou nejčastěji subklinické (Burr et al., 2012). Myši C3H/He jsou zvláště náchylné k giardióze, zatímco myši BALB/c a C57BL/10 jsou odolnější. Navíc se zdá, že myši samice jsou odolnější vůči infekci než myši samci. Např. samice C57BL/6 mají nižší trofozoitní zátěž a kratší interval než myši samci. Samice také vylučují cysty později než myši samci. Tyto rozdíly mohou souviset se silnější humorální imunitní odpovědí na *G. muris* u myších samic (Whary et al., 2015). Odhaduje se, že lidský patogen, *G. intestinalis*, způsobuje každoročně 300 milionů případů giardiózy na světě. Giardióza je také problémem u domácích zvířat (Xu et al., 2020; Jothikumar et al., 2021). Ryby a další vodní živočichové představují pro člověka zdroj infekce *G. intestinalis* prostřednictvím kontaminace vody a konzumace

---

nedostatečně tepelně upravených potravin (Ryan a Zahedi, 2019; Jothikumar et al., 2021).

## 1.5 Onemocnění

Prvoci jsou jednobuněčná eukaryota, o kterých je známo, že způsobují lidská onemocnění, jako je malárie, giardiáza a trichomoniáza (Escalante et al., 2016). Trofozoiti *S. muris* se běžně vyskytují ve střevech v duodenu. Nacházejí se extracelulárně mezi klky, v Lieberkühnových kryptách a centrálním lumenu. Nezpůsobují ovšem výrazné poškození sliznice. Mikroskopicky je akutní onemocnění spojeno s hyperplazií sliznice a zánětlivým edémem s výskytem mononukleárních buněk (lymfocytů, monocytů atd.). Klinicky postižení jedinci mohou mít špatnou srst, depresi, apatii a úbytek hmotnosti. Může se u nich vyvinout dehydratace, shrbené držení těla, distenze břicha a průjem. Závažné infekce mohou být i smrtelné (Fox et al., 2002; Baker, 2006; Burr et al., 2012; Greaves, 2012; Whary et al., 2015).

U divokých a laboratorních myší někteří prvoci způsobují onemocnění, zatímco jiní prvoci, jako jsou *Entamoeba muris* a *T. muris*, jsou považováni za nepatogenní součást myšího mikrobiomu. Nedávné studie však naznačují, že *T. muris* a příbuzný organismus, *T. musculus*, mají potenciál být patogenní. Přítomnost těchto prvoků ve střevní mikroflóře podporuje imunitní odpověď a zánět. V přítomnosti jiného patogenního prvoka může mít onemocnění horší průběh (Escalante et al., 2016; Da Costa et al., 2019).

Je pouze málo informací o patologických změnách, ke kterým dochází u potkanů a myší infikovaných *G. muris*. Patologické změny zahrnují postižení klků, zvýšený počet intraepiteliálních lymfocytů a žírných buněk a hladiny laktázy, sacharázy a maltázy se snižují v tenkém střevě. Infekce *G. muris* je většinou asymptomatická. Klinický projev infekce se pohybuje od asymptomatického stavu až po gastrointestinální potíže, jako je průjem, slabost, ztráta hmotnosti, bolest břicha a možná nevolnost, zvracení, plynatost, horečka, snížený zájem o předměty v okolí, zpomalené reakce, abnormální ospalost až apatii, hrubou srst a distenzi břicha. Imunodeficientní myši mohou zemřít během těžké infekce. U křečků a jiných hlodavců může organismus proniknout do střevního epitelu a lymfatickým a krevním řečištěm cestovat do plic a dalších orgánů. U zvířat klinicky postižených giardiózou je v tenkém střevě často nalezen žlutobílý vodnatý obsah. Histologicky se parazit



---

obvykle nachází na okraji tenkého střeva, ale lze jej nalézt i v lumen. Oválné cysty se nacházejí většinou v tlustém střevě (Baker, 2006; Burr et al., 2012; Greaves, 2012; Dreesen et al., 2014; Whary et al., 2015; Garcia et al., 2018).

Vyčerpání živin je nežádoucím důsledkem gastrointestinálních parazitárních infekcí. Vyčerpání vody a elektrolytů je nebezpečím u jedinců s těžkým průjmem, který může způsobit až smrt (Garcia et al., 2018).

## 1.6 Léčba

*S. muris* nezpůsobuje klinické onemocnění u křečka, proto nemusí být křečci nijak léčeni. U myši se léčba vyžaduje. Přidává se 0,1% dimetridazol do pitné vody po dobu 2 týdnů. Stejná léčba je prováděna u giardiózy (Fox et al., 2002; Brown a Donnelly, 2012; Burr et al., 2012; Whary et al., 2015; Voros et al., 2021).

*Tritrichomonas* spp. jsou anaerobní parazité, kteří rostou při nízkém obsahu kyslíku. Využívají glykolytickou dráhu jako prostředek k produkci energie, která zahrnuje rozklad glukózy na pyruvát nebo sukcinát. Glykolytická dráha u *T. muris* je blokována metronidazolem, a proto je využíván k léčbě. Metronidazol může být podáván intragastricky v dávce 80 mg/den po dobu 6 dnů (Burr et al., 2012; Da Costa et al., 2019). Nebo může být přidáván do pitné vody. Vhodný je i tinidazol (Baker, 2007). Antibiotická léčba však mění bakteriální složení ve střevech, což by mohlo mít další nežádoucí účinky (Escalante et al., 2016)

Léčba se obvykle neprovádí vzhledem k obecně nepatogenní povaze infekce *G. muris*. V některých studiích jsou potřeba potkani a myši proští *G. muris*, léčba Metronidazolem ale infekci většinou zcela nevymýtí. Proto je důležitá prevence a kontrola založená na správné hygieně, včetně adekvátní dezinfekce, přísných karanténních postupech a testování nových zvířat. Cysty mohou být zničeny 2,5% fenolem nebo lysolem, teplotami nad 50 °C a ultrafialovým světlem. Chlorace není pro zničení cyst moc úspěšná (Baker, 2006; Burr et al., 2012; Whary et al., 2015). Bylo prokázáno, že útlum imunitní odpovědi při léčbě kortikosteroidy nejen zvyšuje počet parazitů ve střevě, ale také způsobuje recidivu střevních infekcí (Greaves, 2012). Myši giardiózu lze léčit přidáním 0,1% dimetridazolu do pitné vody po dobu 14 dnů. Metronidazol, i když je účinný proti *G. muris* u myši, není užitečný při léčbě křečků, a to ani v dávkách 16krát vyšších než u myši (Brown a Donnelly, 2012; Burr et al., 2012; Whary et al., 2015). Chinakrin, amodiachin a chlorokrin byly popsány jako potenciálně účinné léky pro léčbu giardiózy (Burr et al., 2012).

---

## 2 Metody detekce

### 2.1 Historie

První pokusy o léčitelství jsou zařazeny do období pravěku. Jednalo se především o přírodní léčitelství a rituální obřady. Ve starověkém Egyptě se věřilo, že nemoci jsou způsobeny jinou bytostí, která vnikla do organismu. V tomto období stále nebylo povědomí o příčinách nemocí. Až lékaři za dob Hippokrata (3. století př. n. l.) zjišťovali u nemocných symptomy nemoci a vliv životního prostředí na zdraví. Ve středověku bylo hlavní diagnostickou metodou vyšetření moče. Hodnotila se barva, zápach a chuť. V období renesance byly již povolené pitvy a začala se rozvíjet diagnostika nemocí a chirurgie. Do té doby se myslelo, že anatomie zvířat a lidí je totožná. V 16. až 17. století se také začala zavádět iatrochemie, která se snažila o spojení chemie s lékařstvím. Hlavním zakladatelem iatrochemie byl Paracelsus, který měl názor, že zdraví závisí na normálním stavu orgánů a sekretů. Tento názor koresponduje i se současnou biochemickou vědou (Švejdová, 2011; Castiglioni, 2018).

Převratným vynálezem v diagnostice byl mikroskop, který umožnil lépe poznat strukturu a stavbu organismů. První mikroskop sestrojil holandský vynálezce Anton van Leewenhoek v 17. století. Tento mikroskop byl použitelný ke studiu mikrobů a buněk. I zásluhou tohoto objevu se naskytly možnosti objevit další struktury organismů. Zavedla se i diagnostická metoda mikroskopie moče – tzv. uroskopie. V 19. století nastal velký pokrok v diagnostice. Došlo ke zdokonalování mikroskopu, který byl sice vynalezen již v době osvícenství, avšak měl spoustu nedostatků. Na zdokonalení se podílel Joseph Lister, lékaři Robert Koch a Rudolf Virchow. Rudolf Virchow je též zakladatel buněčné teorie (Říhová a kol., 2005; Švejdová, 2011; Ackerknecht, 2016, Castiglioni, 2018).

Diagnostika nemocí se po staletí obešla bez složitější techniky, ale potřeba přesnějšího zaznamenávání a hodnocení fyziologických procesů a patologických změn sílila. Proto vznikla nová zobrazovací a měřicí zařízení. V 1. polovině 20. století se znalosti z jednotlivých oborů medicíny rozrůstaly velkou rychlostí, proto začalo docházet ke specializaci na jednotlivé obory. Pokrok zaznamenala endokrinologie (objev inzulínu) a také imunologie (Říhová a kol., 2005; Švejdová, 2011; Ackerknecht, 2016).

---

V roce 1953 byla objevena struktura DNA Jamesem Watsonem a Francisem Crickem. Dalších několik desetiletí trvalo, než byl rozluštěn celý genetický kód člověka. Zásadou tohoto objevu bylo odhaleno spousty dalších onemocnění. V 50. letech 20. století bylo zavedeno mnoho nových diagnostických metod a docházelo k dalšímu zdokonalování laboratorních detekčních metod (Říhová a kol., 2005; Švejnová, 2011; Ackerknecht, 2016, Castiglioni, 2018).

## **2.2 Kultivace**

Kultivace má v klinické laboratoři již omezený význam, ale pro většinu výzkumných laboratoří je nezbytná. Přestože kultivace střevních prvoků má dlouhou historii, ne všichni parazité dokážou růst *in vitro*. Bez schopnosti kultivovat organismy lze provést jen málo studií nad rámec morfologických nebo patologických popisů. Kultivace je předpokladem zvláště pro studie, které vyžadují velké množství buněk. Střevní parazité jsou různorodá skupina organismů, ale mnoho kultivačních médií a používaných principů je často společných pro více druhů parazitů (Abd el Ghaffar et al., 1994; Clark a Diamond, 2002; Mata-Cárdenas et al. 2012; Adamberg et al., 2015; Garcia et al., 2018; Sutrave a Richter 2021; Castelli et al., 2023; Feix et al., 2023)

Kultivace jako detekční metoda je obvykle méně citlivá než mikroskopie. Mikroskopie je stále hojně využívána pro identifikaci střevních parazitů ve vzorcích stolice. Na rozdíl od bakterií je obtížné, nákladné a pracné udržovat tyto organismy v laboratoři, a proto je kultivace využívána jen omezeně jako detekční metoda střevních parazitů. Existují tři základní typy kultivačních systémů. Prvním je xenický kultivační systém, ve kterém je parazit kultivován v přítomnosti nedefinované mikroflóry. Druhým je monoxenický kultivační systém, ve kterém je parazit kultivován v přítomnosti jediného dalšího druhu. Třetím je axenický kultivační systém, ve kterém je parazit kultivován v nepřítomnosti jakýchkoli jiných metabolizujících buněk. Termín polyxenický kultivační systém se někdy mylně používá jako synonymum pro xenický. Polyxenický by se však měl vztahovat pouze na kultury, v nichž jsou známy všechny přítomné organismy. Kontrola nebo eliminace růstu bakterií a plísní je zásadní pro úspěch při kultivaci parazitů. To platí i pro xenickou kulturu, ve které je důležité dosáhnout rovnováhy mezi potřebami bakteriální mikroflóry a eukaryoty (parazity). Xenické a monoxenické kultivace se dnes používají jen zřídka. Velikost inokula pro delší inkubační dobu by měla být

---

menší než pro kratší inkubace (Clark a Diamond, 2002; Mata-Cárdenas et al. 2012; Garcia et al., 2018; Castelli et al., 2023; Feix et al., 2023).

U axenické kultury se parazité přenášejí v intervalech 72-96 hodin. Kultury se chladí v ledové vodní lázni po dobu 5 minut, aby se uvolnily trofozoity připojené ke skleněné kultivační zkumavce. Zkumavky se několikrát obrátí, aby se buňky rozptýlily a odměřené inokulum se asepticky přeneslo do další kultivační zkumavky obsahující čerstvé médium. Zkumavky se pevně uzavřou a inkubují při teplotě 36 až 37 °C, a to buď vertikálně nebo při 5° horizontálně (Abd el Ghaffar et al., 1994; Clark a Diamond, 2002; Mata-Cárdenas et al. 2012; Garcia et al., 2018; Sutrave a Richter 2021; Feix et al., 2023).

Hojně využívané médium pro *Giardia*, *Spironucleus* a *Tritrichomonas* spp. je TYI-S-33 a TYM. Tyto média obsahují tryptikázu, kvasnicový extrakt, maltózu hydrochlorid L-cysteinu; kyselinu askorbovou, fosforečnan draselný, hovězí sérum a vodu. Byly také publikovány metody získávání klonovaných kolonií na agaru. Variace ve složení mezi jednotlivými šaržemi média mohou mít velký vliv. Tryptikáza, kvasnicový extrakt, hovězí sérum a kvalita vody jsou nejčastěji postiženými složkami média, ale i typ skla použitého při výrobě kultivačních zkumavek může způsobit problémy. Pokud je to možné, měly by se používat zkumavky z borosilikátového skla se šroubovacím uzávěrem (Abd el Ghaffar et al., 1994; Clark a Diamond, 2002; Mata-Cárdenas et al. 2012; Garcia et al., 2018; Sutrave a Richter 2021; Castelli et al., 2023; Feix et al., 2023).

V 90. letech 20. století byly zavedeny postupy kultivace agarových destiček a zjistilo se, že jsou 1,6 až 6krát citlivější než metody přímého nátěru. Ukázalo se však, že molekulární metody detekce parazitů jsou v zásadě lepší, a tak se metoda kultivace na agarových destičkách nepoužívá (Garcia et al., 2018).

### **2.3 Mikroskopie**

Střevní parazity lze pozorovat běžnými světelnými mikroskopy vybavenými objektivy se zvětšeními 10× a 40× a také pomocí objektivů s olejovou imerzí se zvětšením 100×. U trofozoitů se sleduje velikost, tvar, jádro (relativní velikost, tvar, poloha, perikaryosomální prostor, periferní chromatin a chromatinová granula), cytoplazmu (zbarvení, vakuoly atd.) a další charakteristiky (axostyl, řasinky, bičíky atd.). U cyst prvoků se pozoruje velikost, tvar, tloušťka stěny, jádro, cytoplazma, bičíky atd. Artefakty nalezené ve fekálních vzorcích mohou velmi připomínat

---

parazity. Proto je pro detekci parazitů ve stolici potřeba kvalifikovaný laboratorní personál. Pro mikroskopické vyšetření se používají metody přímého nátěru, kdy se smíchá malé množství čerstvé stolice s několika kapkami 0,85% fyziologického roztoku. Mezi další metody patří koncentrační postupy (např. flotace se síranem zinečnatým umožňující oddělení většiny parazitů od fekálních zbytků) a nátěry s trvalým barvením. K barvení jsou nejvíce používány různé druhy trichromů (např. Gomoriho, Massonovy atd.) nebo hematoxilin-eosin. Před stanovením negativního výsledku by mělo být vyšetřeno minimálně 300 polí. (Harrington, 2008; Stensvold et al., 2012; Meurs et al., 2017; Garcia et al., 2018; Sobotyk et al., 2021; Martínez et al., 2023).

Senzitivita mikroskopie ve srovnání s PCR je daleko menší z hlediska detekce střevních parazitů. Proto je důležitý vývoj molekulárních screeningových metod v kombinaci s mikroskopickými a specializovanými analýzami (Stensvold et al., 2012; Meurs et al., 2017; Garcia et al., 2018; Martínez et al., 2023).

## **2.4 Sérologie**

Sérologie rozlišuje metody detekující protilátky a metody detekující antigen. Pro detekci střevních parazitů se využívají metody detekující antigen ze stolice. Pro střevní parazity není vhodná detekce pomocí metody detekující protilátky. Antigenní sérologické metody využívají specifických protilátek produkovaných proti konkrétním parazitům. Paraziti mají většinou více než jedno stádium životního cyklu. Každé stádium může prezentovat specifické antigeny. Některé antigeny mohou být shodné pro více stádií. Matrice obsahuje navázané protilátky, na které se v průběhu testu vážou antigeny. V poslední době se na trhu objevily komerční diagnostické soupravy ve formě několikakrokové, maximálně desítky minut trvající in situ analýzy. Komerčně dostupné antigenní testy zahrnují enzymovou imunoanalýzu (EIA) a imunochromatografické testy laterálního toku (tzv. rapid testy). Mezi enzymovou imunoanalýzu patří např. metoda ELISA. Sérologické metody jsou citlivější a specifitější než mikroskopie. Imunotesty pro detekci antigenu jsou však obvykle omezeny pouze na pár vybraných organismů (Wilson et al., 2006; McHardy et al., 2014; van Lieshout a Roestenberg, 2015; Garcia et al., 2018).

---

## 2.5 Izolace DNA

Úplně první izolaci DNA provedl švýcarský lékař Friedrich Miescher v roce 1869. Doufal, že se mu podaří rozluštit základní principy života a určit chemické složení buněk. Během svých testů si všiml, že se látka vysráží z roztoku, když se přidá kyselina, a znovu se rozpustí, když se přidá zásada. První z těchto jevů se nazývá denaturace a druhý jev je označován jako redenaturace (Tan a Yiap, 2009; Beránek, 2016; Figueroa-Bossi et al., 2022).

Izolace DNA je základní metodou používanou v molekulární biologii. Je výchozím bodem pro následné procesy a testy. DNA je biomolekula, která může být izolována z téměř jakéhokoli biologického materiálu pro následné analytické účely. Ovšem podle typu biologického materiálu jsou voleny způsoby izolace nukleových kyselin. V minulosti byl proces extrakce a purifikace nukleových kyselin komplikovaný, časově náročný a pracný. V současné době existuje mnoho specializovaných metod, které lze použít k izolaci biomolekul. Metoda izolace a purifikace nukleových kyselin využívá fyzikální a chemické procesy k získání DNA, která by měla být čistá a kvalitní. Manuální metody jsou často prováděny za pomoci různých komerčních kitů, které zahrnují kompletní soupravy obsahující většinu složek potřebných k izolaci nukleových kyselin. Většina z nich vyžaduje opakované kroky centrifugace, následované odstraněním supernatantů (v závislosti na typu vzorku) a dalším mechanickým zpracováním. Poptávka po automatizovaných systémech určených pro střední až velké laboratoře v posledních letech roste. Je to alternativa k pracným manuálním metodám. Výtěžnost a čistota biomolekul, stejně jako rychlost, přesnost a spolehlivost izolace by měly být maximální a zároveň by se mělo minimalizovat riziko křížové kontaminace. Cílová nukleová kyselina by neměla obsahovat kontaminanty včetně bílkovin, sacharidů, lipidů nebo jiných nukleových kyselin, například DNA bez RNA nebo RNA bez DNA. Kvalita a také integrita izolované nukleové kyseliny přímo ovlivní výsledky všech následujících procesů (Russell a Sambrook, 2001; Šmarda et al., 2005; Tan a Yiap, 2009; Ares, 2012; Beránek, 2016; Gill et al., 2016; Tagliaferro et al., 2021).

### 2.5.1 Základní kroky

Před samotnou izolací DNA je nutné provést homogenizaci biologického materiálu. Pro homogenizaci existuje několik možných nástrojů. Nejvíce jsou využívány ruční

---

plastové homogenizátory, automatické homogenizátory, kdy se přidávají do vzorku nejčastěji skleněné nebo kovové kuličky a za pomoci třepání dochází k homogenizaci. Využívá se také ultrazvukový homogenizátor a třecí miska s tloučkem. Dalším krokem je lyze buněk, kdy dochází k uvolnění jejich vnitřního obsahu do lyzačního pufru. Příkladem lyzačního pufru je CTAB (cetyl trimethylammonium bromid) a SDS (dodecylsírán sodný). Následně je provedena denaturace a vysrážení kontaminantů jako jsou bílkoviny. Při tomto kroku dochází také k oddělení DNA od buněčných zbytků. Hojně je využíván fenol a chloroform. Při této fázi je využíván rozdíl rozpustnosti molekul za vzniku dvou nemísitelných látek. Tyto fáze se od sebe oddělí pomocí centrifugace. DNA je přítomna v horní vodné fázi. Dále dochází k vysrážení neboli precipitaci DNA v důsledku působení absolutního ethanolu nebo isopropanolu. Takto vysráženou DNA je nutno přechistit od zbývajících kontaminantů. Pro přechistění je využíván většinou chlazený ethanol (na 4 °C). Po tomto kroku na dně zůstává průhledný pelet, který je nutno důkladně vysušit a následně rozpustit v elučním pufru. Eluční pufr je většinou slabý roztok Tris a EDTA, který udržuje stabilní pH a blokuje nežádoucí činnost DNáz a RNáz (Šmarda et al., 2005; Tan a Yiap, 2009; Ares, 2012; Beránek, 2016; Gill et al., 2016; Tagliaferro et al., 2021).

### **2.5.2 Druhy izolace DNA**

Fenol-chloroformová izolace je prováděna za použití fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 25:24:1. Existuje řada modifikací této metody pro různé typy biologického materiálu. Tato metoda zahrnuje lýzu buněk fenolem. Druhá fáze se vytvoří po přidání chloroformu, kde se extrahuje DNA. DNA se vysráží ethanolem nebo isopropanolem a následně je rozpuštěna v elučním pufru. Při této metodě izolace je nutné dodržovat striktně bezpečnost práce a používat ochranné pomůcky. Používané chemické látky jsou totiž zdraví nebezpečné (Šmarda et al., 2005; Zoetendal et al., 2006; Tan a Yiap, 2009; Ares, 2012; Beránek, 2016; Figueroa-Bossi et al., 2022).

V nedávné době bylo na trh uvedeno několik komerčních souprav typu „vše v jednom“. Například kolonková extrakční metoda, která je určena k izolaci genomové DNA, celkové RNA a proteinu z jednoho biologického vzorku současně, bez použití toxických látek, jako je fenol nebo chloroform a bez srážení alkoholem. Tyto soupravy neboli kity obsahují veškeré spotřební plasty a chemikálie. Umožňuje

---

rychlou a účinnou izolaci ve srovnání s konvenčními metodami. Tato metoda se obvykle provádí pomocí kolonky, která propouští kapalinu pouze za vysokých otáček. Membrána kolonky je vyrobena z oxidu křemičitého. Kolonková metoda zahrnuje čtyři klíčové kroky: lyzi buněk, adsorpci nukleových kyselin na membránu, promývání a eluci. Pro adsorpci nukleové kyseliny je nutná počáteční aktivace kolonky. Dále se na kolonku aplikuje vzorek, který byl degradován pomocí lyzačního pufru. Požadovaná nukleová kyselina se váže na kolonku pomocí vazebného roztoku. Jiné sloučeniny, jako jsou proteiny, mohou mít také silnou specifickou vazbu s povrchem kolonky. Tyto kontaminanty mohou být odstraněny v promývacím kroku pomocí promývacího pufru. Pro krok eluce se používá eluční pufr nebo voda, aby se uvolnila požadovaná nukleová kyselina z kolonky (Zoetendal et al., 2006; Tan a Yiap, 2009; Gill et al., 2016; Tagliaferro et al., 2021; Figueroa-Bossi et al., 2022).

Magnetická izolace na bázi magnetických kuliček je jednoduchý a účinný způsob izolace. Pro izolační proces se často používají magnetické nosiče s imobilizovanými afinitními ligandy. Princip je založen na alkalické lýze s následnou vazbou nukleové kyseliny na magnetické částice. Poté dochází k zachycení magnetických částic s navázanou nukleovou kyselinou. Kontaminanty jsou odstraněny promytím pomocí promývacího pufru. Nukleová kyselina je poté uvolněna z magnetických částic elučním pufrem. K zachycení magnetických částic se používá magnetická tyč (Tan a Yiap, 2009; Tagliaferro et al., 2021; Figueroa-Bossi et al., 2022).

Automatizovaný systém extrakce nukleových kyselin byl vyvinut v důsledku vlivu rychlého růstu automatizační technologie v dnešní době. Automatizovaný extrakční systém je velký, drahý a složitý přístroj určený pro vysokokapacitní zpracování vzorků a pomohl zjednodušit izolaci nukleových kyselin. Tento systém byl navržen pro střední až velké laboratoře. Automatizace procesu extrakce nukleových kyselin je potenciálně přínosná z mnoha důvodů, včetně zkrácení pracovní doby, snížení nákladů na pracovní sílu, zvýšení bezpečnosti pracovníků a poskytuje příležitost ke zvýšení reprodukovatelnosti a kvality výsledků. Kromě toho je klíčovým řešením pro zvýšení efektivity laboratoře. Jedná se o systém s paramagnetickými částicemi, který zpracovává vzorek a poskytuje konzistentní výtěžnost a čistotu. Celý proces extrakce trvá asi 20 minut. Tato metoda izolace



---

DNA zahrnuje pouze dva kroky: přidání vzorků do kazety s reagensii a vložení kazety s reagensii do stroje. DNA je na konci procesu uvolňována do elučního pufru (Tan a Yiap, 2009; Tagliaferro et al., 2021).

## 2.6 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) patří mezi základní a nejpoužívanější molekulární metody. PCR objevil Kary B. Mullis v roce 1985 a v roce 1993 byl za objev PCR oceněn Nobelovou cenou za chemii. Jedná se o metodu, která je založena na využití enzymu DNA polymerázy. DNA polymeráza množí specifické fragmenty DNA v podmínkách in vitro. Pomocí této metody se mohou vytvořit desítky miliard kopií cílové sekvence DNA, která je získána ze vzorku obsahující tuto cílovou sekvenci DNA. Cílová sekvence DNA získaná ze vzorku je označována jako templát. Při použití termostabilní DNA polymerázy získané z bakterie *Thermus aquaticus*, již nebylo potřeba po každém cyklu přidávat do reakční směsi DNA polymerázu. *Thermus aquaticus* žije v horkých pramenech. Proto termostabilní DNA polymeráza (*Taq* polymeráza) vydrží expozici vyšším teplotám, které jsou potřeba pro prvotní krok PCR – denuraci. Veškeré získané produkty z předchozího cyklu slouží jako templáty v následujících cyklech. V důsledku toho dochází k exponenciálnímu nárůstu počtu specifických fragmentů. Vznikající fragmenty jsou ohraničeny krátkými oligonukleotidy, které se nazývají primery. Tyto krátké oligonukleotidy jsou chemicky syntetizované. Primery mají nejčastěji délku 18 – 25 bází a pro amplifikaci je potřeba minimálně jeden pár primerů. Jejich sekvence je komplementární se začátkem zkoumané sekvence DNA ve směru 5' - 3' (tzv. forward primer) a začátkem zkoumané sekvence DNA ve směru 3' - 5' (tzv. reverse primer) a není komplementární s žádným jiným úsekem DNA. Forward i reverse primery by měly mít stejný poměr GC a AT bází, měly by obsahovat 40 – 60 % GC bází a měly by být navrženy tak, aby nebyly k sobě komplementární, jelikož by vytvářely self-dimery a nedocházelo by k amplifikaci DNA templátu. Problémem může být také tvorba vlásenky, která vzniká, když je jeden z primerů komplementární sám k sobě (Šmarda et al., 2005; Garibyan a Avashia, 2013; Rahman et al., 2013; Beránek, 2016; Clark et al., 2019; Kadri, 2020).

Reakční směs tedy obsahuje DNA templát, *Taq* polymerázu, primery, směs čtyř deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTPs) – dATP, dTTP, dCTP a dGTP; Mg<sup>2+</sup> a pufrující roztok (obsahuje Tris-HCl, KCl, Tween 20, Triton X-100 a glycerol).

---

Mg<sup>2+</sup> ionty slouží ke stabilizaci primertemplátového komplexu a váží se s dNTPs a tvoří tak komplexy, které jsou vhodným substrátem pro DNA polymerázu. Reakční směs je vystavena cyklickým změnám teplot v termobloku, který je součástí PCR cyklieru. PCR cycler je přístroj, který mění velmi rychle a přesně teploty bloku v rozmezí 0 – 100 °C (Šmarda et al., 2005; Garibyan a Avashia, 2013; Beránek, 2016; Kadri, 2020).

PCR reakce má tři fáze – denaturace, annealing a elongace. V průběhu denaturace dochází k oddělení dvou vláken DNA pomocí rozpojení vodíkových můstků tvořících dvoušroubovici DNA, vzniká tak jednovláknová DNA. K denaturaci dochází vlivem teploty, která se pohybuje v rozmezí 94 – 98 °C. Na začátek reakce bývá zařazována úvodní denaturace trvající několik minut. Na začátku jednotlivých cyklů probíhá denaturace trvající 30 – 60 vteřin. Annealing je druhý krok cyklu. Během něj dochází k nasedání primerů na templátovou DNA. Teplota se pohybuje v rozmezí 50 – 70 °C. Teplota annealingu se volí podle použitých primerů. Nejvíce záleží na délce sekvence primeru a obsahu GC bazí. Annealing probíhá 15 – 60 vteřin. Během elongace dochází k syntéze nových komplementárních vláken podle templátu. *Taq* polymeráza je schopna se navázat na primertemplátový komplex a syntetizovat komplementární vlákno za použití deoxyribonukleotidů z reakční směsi. Počet cyklů závisí na množství templátu (objemu a koncentraci), který je vložen do reakce. Počet cyklů se pohybuje mezi 20 – 40 cykly (Abd-Elsalam, 2003; Šmarda et al., 2005; Beránek, 2016; Clark et al., 2019; Kadri, 2020).

Detekce a vizualizace vzniklých fragmentů se nejčastěji provádí pomocí elektroforetických metod (viz dále). Tato základní metoda PCR je někdy označovaná jako end-point PCR (Šmarda et al., 2005; Beránek, 2016; Kadri, 2020).

### **2.6.1 Modifikace PCR**

Existuje velké množství modifikací PCR. Mezi nejvyužívanější modifikace patří například hot start PCR, multiplex PCR, nested PCR a real-time PCR (Šmarda et al., 2005; Beránek, 2016; Clark et al., 2019).

Hot start PCR využívá DNA polymerázu, na kterou je navázaná protilátka blokující aktivitu polymerázy. Hot start PCR vyžaduje úvodní denaturační krok, při kterém dochází k uvolnění protilátky a tím k aktivaci polymerázy. Použitím takto

---

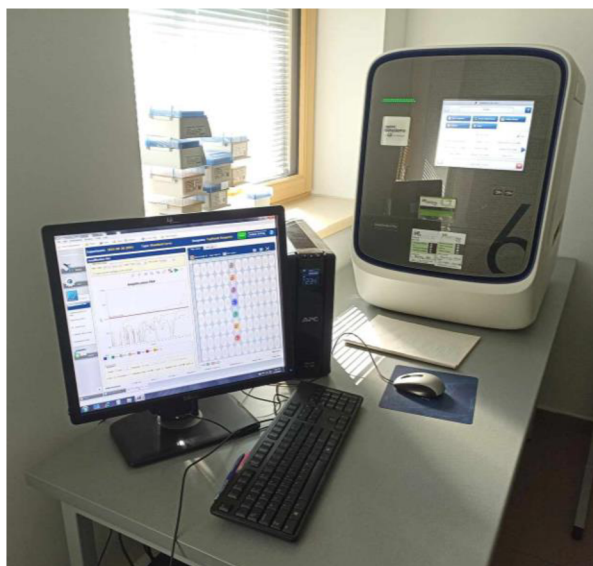
upravené DNA polymerázy se zabraňuje nespecifické amplifikaci (Beránek, 2016; Clark et al., 2019).

Pro multiplex PCR je použito několik párů primerů najednou. Tudíž se mohou v jedné reakci detekovat několik cílových oblastí DNA. Používá se například pro detekci původců onemocnění. Primery pro tento typ reakcí musí mít podobné podmínky annealingu a nesmí interagovat mezi sebou. Také je důležité, aby každý pár primerů ohraničoval fragment DNA s dostatečně odlišnou délkou (Šmarda et al., 2005; Garcia et al., 2018; Clark et al., 2019).

Při nested PCR jsou ve dvou po sobě jdoucích reakcích postupně použity dva páry primerů. Produkt první reakce je využit jako templát pro druhou PCR reakci. Zásadou dvou po sobě jdoucích PCR reakcí je dosaženo vyšší citlivosti a specifity a zároveň nedochází k další amplifikaci nespecifických fragmentů vznikajících během první PCR reakce (Šmarda et al., 2005; Clark et al., 2019; Green a Sambrook, 2019).

## **2.7 Real-time PCR**

Real-time PCR neboli polymerázová řetězová reakce v reálném čase je modifikace metody PCR. Na rozdíl od klasické PCR umožňuje kvantifikaci amplifikované DNA. I proto se tato metoda občas označuje také jako qPCR (quantitative PCR). Real-time PCR využívá speciální cycler (obr. 1), který zaznamenává průběh reakce po každém cyklu. Od toho je odvozen název real-time PCR, tedy monitorování amplifikace v reálném čase. Nejčastější využití této modifikace PCR je kvantifikace genové exprese, potravinářství, detekce GMO a medicínská diagnostika. Pod medicínskou diagnostiku spadá například detekce infekčních nemocí a rakovinových buněk. Podle rychlosti nárůstu množství amplifikované DNA na detekovatelnou úroveň je možno vypočítat množství templátu ve vzorku. Real-time PCR je velmi citlivá metoda a nemusí být následována další vizualizační metodou (Bustin, 2005; Šmarda et al., 2005; Garibyan a Avashia, 2013; Beránek, 2016).



**Obrázek 1: Příklad přístroje pro real-time PCR**

Složení reakce je v principu stejné jako u klasické PCR. Často jsou využívány komerčně dodávané reakční směsi (mastermixy). Mastermix obsahuje DNA polymerázu, nukleotidy, hořčičkové ionty, a pufr. Reakční směs dále obsahuje primery, templátovou DNA a případně sondy a fluorescenční barvivo. Reakce probíhá v termocycleru a zahrnuje denaturaci dvouvláknové DNA a nasedání primerů. Samotný přístroj pro real-time PCR se skládá z cycleru, světelného zdroje (LED nebo halogenová lampa) a detektoru, který zaznamenává vznikající fluorescence (Šmarda et al., 2005; Garibyan a Avashia, 2013; Navarro et al., 2015; Beránek, 2016).

Fluorescence vzniká pomocí interkalačního barviva nebo pomocí fluorescenčně značené sondy. Mezi interkalační barviva patří například SYBR<sup>®</sup>Green či EvaGreen a mezi systém využívající fluorescenčně značené sondy patří například TaqMan, Molecular beacon a Scorpions. Nespecifická fluorescence vzniká pomocí interkalačního barviva. Interkalační barviva se vážou na každou dvouvláknovou DNA a je třeba počítat s tím, že dochází k obarvení amplifikovaných úseků DNA jak specificky, tak i nespecificky vzniklých, proto se doporučuje provádět analýzu křivky tání. Výhodou interkalačního barviva je zejména jeho relativně nízká cena a jeho univerzálnost použití. Nevýhodou je poměrně rychlá fotodegradace a již zmíněná nespecifičnost (Šmarda et al., 2005; Valasek a Repa, 2005; Navarro et al., 2015).

---

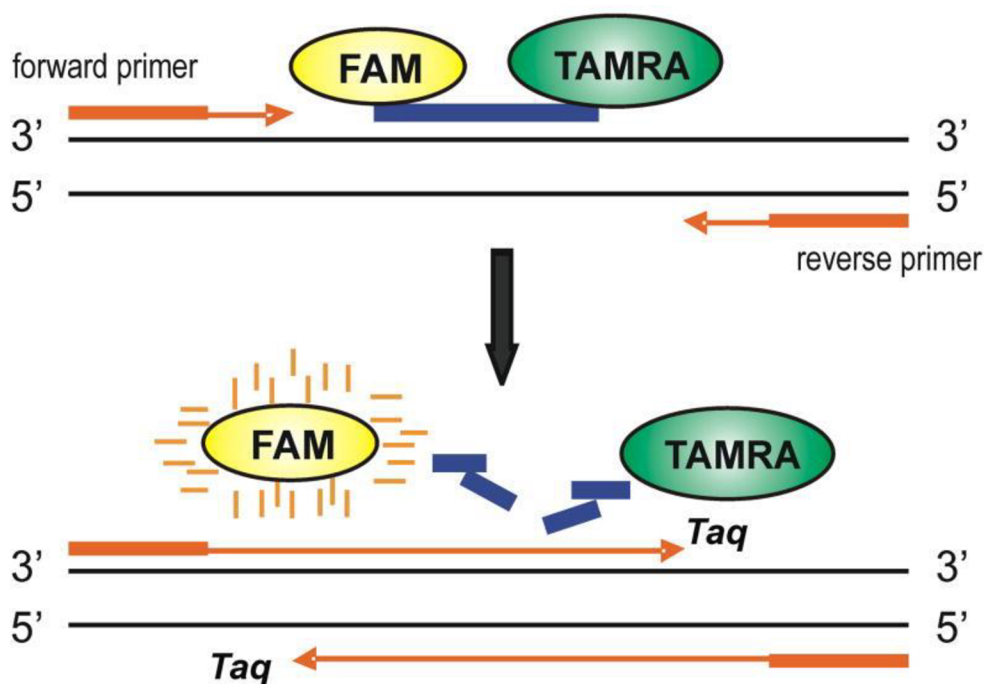
Křivka tání se provádí pouze u nespecificky vzniklé fluorescence (např. u SYBR<sup>®</sup>Green). Během analýzy křivky tání dochází k postupnému zahřívání vzorku od 50 °C do 95 °C a průběžně se měří fluorescence. Během denaturace DNA dochází k prudkému poklesu fluorescenčního signálu z důvodu oddělení barviva. Nespecifické fragmenty a self-dimery jsou denaturovány při nižších teplotách než specifický produkt. Křivka tání zobrazuje průběh poklesu fluorescence v závislosti na zvyšující se teplotě a prudký pokles je zaznamenán při teplotě odpovídající hodnotě  $T_m$  (teplota tání, melting temperature) (Valasek a Repa, 2005; Navarro et al., 2015).

Specifická fluorescence vzniká za použití fluorescenčně značených sond. Značené sondy se specificky vážou k určitému úseku uvnitř amplifikovaného úseku DNA. Vlivem této vazby se mění její fluorescenční vlastnosti. Jejich výhodou je mnohem vyšší specifická. (Beránek, 2016).

Molecular beacon jsou jednořetězcové oligonukleotidové sondy. Mají strukturu vlásenky. Smyčka vlásenky je komplementární k dané sekvenci DNA, která se nachází uvnitř amplifikovaného úseku DNA. Konce vlásenky jsou tvořeny navzájem komplementárními úseky odlišnými od sekvence amplifikovaného úseku. Na každém z konců těchto komplementárních úseků se nachází reportér a zhášec. Pokud není sonda v zhybridizovaném stavu, má svoji vlásenkovou strukturu. Tudiž je reportér a zhášec v těsné blízkosti a nedochází ke vzniku fluorescence. Pokud dojde k hybridizaci, struktura sondy se změní, reportér a zhášec se od sebe prostorově oddálí a dojde ke vzniku fluorescence (Tyagi a Kramer, 1996; Monroy-Contreras a Vaca, 2011; Pandya et al., 2022).

Scorpions primer se skládá ze specifické sekvence, která má konfiguraci vlásenkové smyčky. Vlášenska má konce k sobě komplementární. Fluorofor (reportér) připojený k 5'konci je zhášen částí připojenou k 3' konci smyčky (zhášec). 5' koncová část primeru je s vlásenkou spojena přes hexyethylenglykol, který blokuje její kopírování. Po elongaci během PCR amplifikace je specifická sekvence primeru schopna se vázat na svůj komplementární úsek v rámci stejného řetězce DNA. Tato hybridizační událost otevírá vlásenkovou smyčku, takže fluorescence již není zhášena a je pozorován nárůst signálu (Whitcombe et al., 1999; Thelwell et al., 2000).

TaqMan systém využívá pro detekci a kvantifikaci PCR produktu fluorescenčně značených sond. TaqMan sondy jsou jednou z nejpoužívanějších detekčních technik real-time PCR. Oligonukleotidová sonda má na svém 5' konci fluorescenční značku, která se nazývá reportér a na 3' konci se nachází zhášec. Když je sonda vcelku, zhášec pohlcuje fluorescenci emitovanou reportérem. Během amplifikace DNA úseku je sonda rozštěpena pomocí nukleázové aktivity *Taq* polymerázy. V důsledku toho dojde k prostorovému oddálení reportéru od zhášeče a tím dochází k navýšení fluorescence. Výhodou je, že se TaqMan sondy vážou specificky na cílovou sekvenci DNA, tím pádem nedochází k detekci nespecifických produktů. Nevýhodou je vysoká cena, jelikož pro každou cílovou sekvenci DNA je nutná specifická sonda (Šmarda et al., 2005; Beránek, 2016; Fattahi et al., 2017). Mechanismus vzniku fluorescence u TaqMan real-time PCR je znázorněn na následujícím obrázku (obr. 2).

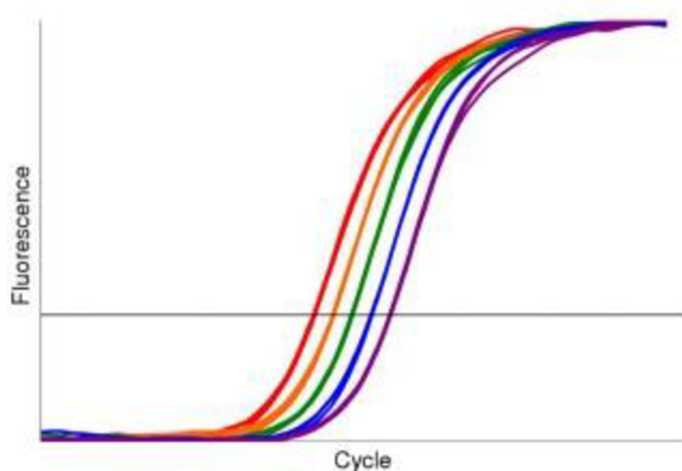


**Obrázek 2: Schématická ilustrace TaqMan real-time PCR (Gangisetty a Reddy, 2009)**

Jednotlivá měření fluorescence jsou znázorněna graficky. Pro každý vzorek je graficky vykreslena baseline, což je křivka, která spojuje hodnoty fluorescence. Tyto křivky následně protíná tzv. threshold. Threshold je přímka, která v průsečících s fluorescenčními křivkami označuje počet cyklů. Odečtením počtu cyklů na ose x, které jsou potřeba k dosažení této fluorescence, u jednotlivých vzorků jsou získány hodnoty Ct. Tyto hodnoty jsou poté využity k odvození počtu kopií cílové DNA

---

ve vzorku. Ct hodnota vzorku, který má dvojnásobně více kopií cílové DNA, je o 1 nižší než u vzorku s polovičním počtem cílových kopií DNA (Rutledge a Cote, 2003; Bustin, 2005; Šmarda et al., 2005; Valasek a Repa, 2005; Beránek, 2016). Grafické znázornění fluorescence je na následujícím obrázku (obr. 3).



**Obrázek 3: Grafické znázornění výsledku real-time PCR (Larionov et al., 2005)**

K vyhodnocení získaných dat lze použít absolutní či komparativní (relativní) kvantifikaci. Absolutní kvantifikace se používá v případě, že je potřeba zjistit skutečný počet kopií cílové sekvence DNA ve vzorku. Před analýzou vzorků je nutné sestavit ředící řadu o známé koncentraci. Po analýze jednotlivých ředění je nutné sestavit standardní křivku. Na základě standardní křivky lze vypočítat počet kopií cílové sekvence DNA. V případě, kdy je potřeba porovnat několik vzorků mezi sebou a určit, u kterého vzorku je kopií cílové DNA více nebo méně, používá se komparativní kvantifikace (Rutledge a Cote, 2003; Bustin, 2005; Jia, 2012; Beránek, 2016).

Dále je důležité ověřit i účinnost reakce – tzn. kolikrát se znásobí počet specifických sekvencí DNA ve vzorku v každém cyklu PCR. V ideálním případě by měla být účinnost 100 % a neměla by být nižší než 90 %. Při 100% účinnosti se v každém cyklu PCR počet sekvencí ve vzorku zdvojnásobí. Efektivitu reakce lze vypočítat podle vzorce:  $E = [10(-1/\text{slope})]-1$ , kde slope je sklon standardní křivky (Rutledge a Cote, 2003; Jia, 2012).

## **2.8 Klonování**

Klonování DNA je metoda, která umožňuje namnožení cílového úseku DNA za pomoci replikačního aparátu živých buněk (hlavně bakterií) in vivo. Pomocí

---

klonování je možné namnožit i velmi dlouhé molekuly DNA v závislosti na použitém vektoru. Vektor je molekula DNA se schopností přijmout cizorodou DNA. Metoda využívá schopnosti malých molekul DNA (tzv. replikonů či vektorů) se replikovat. Vektory mohou být například plazmidy a viry. V bakteriích jsou replikovány za přítomnosti jen krátkého úseku své molekuly, tzv. replikátoru. Jakýkoliv úsek DNA integrovaný do vektoru je v buňce replikován, pokud není integrací replikátor přerušen. Takto může vzniknout libovolné množství cílového úseku DNA. Ke klonování lze použít molekuly různého původu. Klon je soubor identických buněk odvozených z jedné bakteriální kolonie (Russell a Sambrook, 2001; Šmarda et al., 2005; Elliott a Elliott, 2009; Beránek, 2016; Brown, 2020).

Klonování obvykle zahrnuje základní kroky, kterými je izolace fragmentu DNA, který chceme namnožit, rozštěpení původního vektoru v jednom místě a spojení fragmentu DNA s vektorem pomocí ligačního enzymu. Dále dochází k přenesení vektoru s inzertem (fragmentem DNA) do bakterie a k selekci a namnožení bakteriálního klonu (tj. potomstva jedné buňky) obsahující vektor s inzertem. Posledním krokem je izolace DNA vektoru – např. plazmidu s inzertem nebo viru s fragmentem cizí DNA (Russell a Sambrook, 2001; Šmarda et al., 2005; Beránek, 2016; Brown, 2020).

In vitro v nepatrném objemu několika  $\mu\text{l}$  se provádějí první tři kroky procesu klonování za využití specifických enzymů. Další kroky klonování jsou běžné mikrobiologické a biochemické postupy. Mezi speciální klonovací vektory patří plazmidy a bakteriofágy se selekčními systémy, které slouží pro identifikaci klonu s vektorem a s inzertem. Vysoká účinnost selekce eliminuje vcelku neúčinné první kroky klonování a vyrovná fakt, že výchozího fragmentu je jen několik desítek molekul a většinou se najde alespoň jeden klon s integrovanou molekulou fragmentu DNA ve vektoru. Dále se vlivem rychlého množení bakterií namnoží i fragment cílové DNA. Klonování je nezbytným krokem všech manipulací s DNA. Klonování má nevelkou účinnost a přesnost, i přes to je hojně využívanou metodou (Elliott a Elliott, 2009; Beránek, 2016; Brown, 2020).

Základní struktury klonovacích vektorů jsou replikátor (tzn. počátek replikace), struktury selekčního systému (nejčastěji geny pro rezistenci k antibiotiku – např. ampicilinu), polylinker (tj. uměle vytvořené místo, které lze rozštěpit vícero druhů



---

endonukleáz) (Šmarda et al., 2005; Elliott a Elliott, 2009; Beránek, 2016; Brown, 2020).

Jako vektory pro klonování se používají plazmidy, fasmidy, kosmidy, bakteriofágy, umělé bakteriální, lidské a kvasinkové chromozómy. Plazmidy jsou malé kruhové molekuly DNA, do kterých se může inzertovat fragment DNA až o velikosti 15 kb. Přirozeně v bakteriální buňce často slouží jako nositelé genů rezistence k antibiotikům. Plazmidy se množí v cytoplasmě bakterií z velké části nezávisle na bakteriálním nukleoidu. Replikační mechanismy plazmidů využívají bakteriální enzymy a na plazmidu kódované enzymy. Velká většina plazmidových vektorů je odvozena z přirozeného malého plazmidu ColE1 (spíše z jeho derivátu pMB1) a množí se jen v *Escherichia coli*. Fasmidy jsou také bakteriální plazmidy, ale obsahují navíc části bakteriofágového genomu. Kosmidové vektory umožňují inzertovat fragmenty až do velikosti 45 kb. Umělé bakteriální a kvasinkové chromozomy se používají pro klonování velkých fragmentů DNA (Russell a Sambrook, 2001; Šmarda et al., 2005; Beránek, 2016).

## 2.9 Elektroforéza

Elektroforéza je název pro soubor separačních metod. Elektroforéza je metoda využívající k dělení molekul DNA, RNA a bílkovin jejich odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyb molekul nastává v důsledku jejich náboje. Nukleové kyseliny mají přirozeně záporný náboj, který nesou fosfátové skupiny. Proto dochází v elektrickém poli k pohybu k opačně nabitě elektrodě – tzn. anodě. Rychlost pohybu závisí na tvaru molekuly, na poměru náboje k hmotě, a hlavně na velikosti molekuly. Platí tedy, že kratší molekuly migrují rychleji než molekuly delší. Nejčastěji se využívají gelová elektroforéza, čipová elektroforéza a kapilární elektroforéza (Russell a Sambrook, 2001; Šmarda et al., 2005; Lee et al., 2012; Garibyan a Avashia, 2013; Beránek, 2016).

Gelová elektroforéza využívá nejčastěji akrylamidové nebo agarózové gely. Agarózové gely se používají pro separaci molekul o velikosti vyšší než několik set párů bází a akrylamidové gely pro separaci molekul od 1 bp do 300 bp, ale lze i do 1000 bp. Elektroforéza na agarózovém gelu je nejúčinnější způsob separace fragmentů DNA, využívá se hlavně po analýze PCR. Agarózový gel je tvořen sítí ze sdružených polymerů. Touto sítí procházejí molekuly DNA podle své velikosti. Čím je síť řidší, tím větší molekuly mohou sítí procházet. Koncentrace se volí

---

zpravidla od 0,8 % do 3 % agarózy, dá se i upravit podle velikosti očekávaného produktu. DNA fragmenty vzorku se nanáší do jamek, které se v gelu vytvořily pomocí tzv. hřebínku. Gel se přenese do elektroforetické vany s pufrem. Elektrické napětí se volí zpravidla mezi 80-150 V po dobu 1-1,5 hodiny v závislosti na použitém pufru, koncentraci a objemu použitého gelu. Optimální hodnoty napětí by měly být v rozmezí 5-10 V/cm pro nejčastěji používaný pufr TBE (Tris-borátový pufr). Dále je hojně využívaný pufr TAE (Tris-acetátový pufr) (Šmarda et al., 2005; Lee et al., 2012; Beránek, 2016).

Při gelové separaci DNA a RNA je potřeba použít velikostní markery (laddery). Pomocí nich lze co nejpřesněji určit velikost analyzovaného produktu, jelikož marker obsahuje fragmenty o přesně definované velikosti. Jejich rozsah je dán výrobcem. Každý fragment markeru má také jinou koncentraci (sílu) a tím mohou pomoci odhadnout koncentraci produktu (Russell a Sambrook, 2001; Šmarda et al., 2005; Lee et al., 2012).

DNA a RNA fragmenty analyzované na gelové elektroforéze je třeba zviditelnit vhodným interkalačním činidlem. Nejčastěji používaným barvivem je ethidium bromid, SYBR<sup>®</sup>Green, GelRed, SYBR<sup>®</sup>Gold a další. Interkalační činidlo se přidává přímo do gelu nebo lze gel obarvit po elektroforéze. Zobrazení výsledků se provádí pomocí UV záření (Šmarda et al., 2005; Garibyan a Avashia, 2013; Beránek, 2016).

## **2.10 Budoucnost**

V dnešní době jsou na vrcholu molekulární metody, které se nyní nejvíce využívají k detekci parazitárních patogenů. Mezi ně se řadí PCR a její modifikace – např. real-time PCR je v dnešní době hojně využívanou detekční metodou. V budoucnu může docházet ke zdokonalování těchto metod. Budoucnost detekčních metod pro střevní parazity také spočívá např. v POCT (tj. v dostupnosti a přístupnosti testů v místě péče) a nových metodách sekvenování třetí a čtvrté generace. Včasné odhalení pomocí POCT může dramaticky zlepšit klinické výsledky u potenciálně fatálních infekcí. Do budoucna bude kladen důraz na vyvinutí nových, nákladově efektivnějších a technicky jednodušších molekulárních testů, které budou vhodné pro širokou implementaci. Pozornost bude zaměřena i na zjednodušení přípravy vzorku pro analýzu (Momčilović et al., 2019).

---

## **3 Cíl práce a výzkumné otázky**

### **3.1 Cíl práce**

Hlavním cílem této diplomové práce je optimalizovat metodu TaqMan real-time PCR, nalezení specifických primerů a sond pro detekci střevních parazitů jako je *Spironucleus muris*, *Tritrichomonas muris* a *Giardia muris* s využitím vědeckých publikací. Dalšími cíli jsou verifikace na vzorcích bukálních stěrů, biopsií ze střevní tkáně a exkrementů, stanovení specificity TaqMan real-time PCR a stanovení detekčních limitů. Posledním cílem je porovnání vhodnosti jednotlivých typů biologických materiálů k analýze metodou TaqMan real-time PCR.

### **3.2 Výzkumné otázky**

1. Jsou primery a sondy druhově specifické pro jednotlivé střevní parazity?
2. Jaké jsou detekční limity pro jednotlivé eseje metody TaqMan real-time PCR?
3. Jsou všechny typy biologických materiálů stejně vhodné pro analýzu metodou TaqMan real-time PCR pro detekci střevních parazitů?

---

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Izolace DNA

K izolaci byl použit komerční kit RIDA®Xtract 13-10-08 (R-Biopharm AG, Německo). Tímto komerčním kitem bylo izolováno více typů biologického materiálu určeného k izolaci DNA – bukální stěry, biopsie ze střevní tkáně a exkrementy.

#### 4.1.1 Příprava vzorku pro izolaci DNA a lyze buněk

Reakční mikrozkušavky typu Eppendorf byly před použitím stočeny pár sekund v MyFuge (Benchmark Scientific, USA), aby mikrokuličky obsažené v nich sesedly a nedošlo k jejich ztrátě po otevření mikrozkušavky.

Pro izolaci DNA z bukálních stěrů bylo do reakční mikrozkušavky přidáno 400  $\mu$ l Dilution Buffer. Do této reakční směsi byly umístěny bukální stěry. Odběrová souprava na bukální stěry obsahuje sterilní dakronový tampon na plastové tyčince uzavřený v transportním obalu. Pomocí tohoto tamponu bylo provedeno promíchání. Dále byla ustřížena plastová tyčinka s tamponem tak, aby se daly reakční mikrozkušavky zavřít. Dalším krokem byla inkubace při 37 °C po dobu 10 minut a s třepáním při rychlosti 500 rpm v termobloku TS-100 (Biosan, Lotyšsko), dále se zvedla teplota na 65 °C a při této teplotě byla provedena inkubace po dobu 10 minut s třepáním při rychlosti 500 rpm. Pomocí čisté pinzety byly vyjmuty tampony (po každém vyjmutém tamponu se provedlo řádné očištění pomocí ethanolu). Lyze buněk se provedla při 95 °C po dobu 10 minut a s třepáním při rychlosti 500 rpm.

Pro izolaci DNA z biopsie ze střevní tkáně bylo přemístěno 1-10 mg tkáně do reakční mikrozkušavky a přidalo se 400  $\mu$ l Dilution Buffer. Vzorky byly zvortexovány na Bio Vortex V1 (Biosan, Lotyšsko) a byly vloženy do termobloku na 60 minut, 56 °C a bylo zapnuto třepání při rychlosti 500 rpm. Dále byla teplota zvýšena na 95 °C po 10 minut a byla provedena centrifugace při 12 000 otáčkách/minutu po dobu 1 minuty v centrifuze Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Německo).

Pro izolaci DNA ze stolice bylo prvně potřeba zředit stolicí 1:3 s destilovanou vodou, zvortexování po dobu 30 vteřin a centrifugace při 2000 otáčkách/minutu po dobu 3 minut. 200  $\mu$ l supernatantu bylo přeneseno do reakční mikrozkušavky a přidalo se 200  $\mu$ l Dilution Buffer. Dále byly vzorky zvortexovány po dobu

---

10 vteřin. Vzorky byly inkubovány v termobloku při 37 °C po dobu 10 minut a s třepáním při rychlosti 500 rpm.

#### **4.1.2 Adsorpce DNA na membránu, promývání a eluce**

Ke vzorkům se přidalo 400 µl Binding Solution a vzorky byly zvortexovány. Každý vzorek byl přepipetován do Spin filtru vloženého do sběrné zkumavky a byla provedena inkubace při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Dále byla provedena centrifugace (při 12 000 otáčkách/minutu pro bukální stěry a biopsie ze střevní tkáně, 10 000 otáčkách/minutu pro stolici) po dobu 2 minut. Sběrné zkumavky byly vyměněny za nové a do Spin filtru se přidalo 500 µl Wash Buffer 1. Následně byla provedena centrifugace (při 12 000 otáčkách/minutu pro bukální stěry a biopsie ze střevní tkáně, 10 000 otáčkách/minutu pro stolici) po dobu 1 minuty. Opět se provedla výměna sběrných zkumavek a ke Spin filtru bylo přidáno 700 µl Wash Buffer 2. Vzorky byly stočeny (při 12 000 otáčkách/minutu pro bukální stěry a biopsie ze střevní tkáně, 10 000 otáčkách/minutu pro stolici) po dobu 1 minuty. Dále se vyměnily sběrné zkumavky za nové a byla provedena centrifugace „na sucho“ při 12 000 otáčkách/minutu po dobu 4 minut. Spin filtr byl přemístěn do 1,5ml eluční mikrozukavky, přidalo se 60 µl Elution Buffer předeřátého na 65 °C (pro stolici na 80 °C) přímo na membránu Spin filtru. Vzorky se nechaly inkubovat při pokojové teplotě 3 minuty. Na závěr byly vzorky stočeny při 12 000 otáčkách/minutu po dobu 1 minuty. Během centrifugace se do eluční mikrozukavky uvolnil izolát – DNA.

Čistota a koncentrace vyizolované DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) a následně uchována při teplotě - 20 °C.

#### **4.2 TaqMan Real-time PCR**

Real-time PCR byla provedena na přístroji QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems – Life Technologies, USA) a analýza dat byla vypracována v softwaru pro QuantStudio 6 Flex – QuantStudio Real-Time PCR System vl.3. Tvorba grafů a zpracování dat pro vytvoření standardní křivky a další analýzu bylo provedeno v tabulkovém procesoru Microsoft Excel (Microsoft, USA).

Pro TaqMan real-time PCR byly použity primery a sondy navržené v programu Primer Express™ Software v3.0.1 pro geny kódující malou podjednotku ribozomu (rRNA) u *S. muris*, pro gen kódující 5.8S rRNA u *T. muris* a pro gen kódující 16S, 23S a 5.8S rRNA u *G. muris* (Stehlíková, nepublikováno). Použité sondy jsou typu

FAM-BHQ1 (Stehlíková, nepublikováno). Syntéza primerů a sond byla uskutečněna firmou Generi biotech. Sekvence primerů a sond jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 1).

**Tabulka 1: Sekvence primerů a TaqMan sond (Stehlíková, nepublikováno)**

Střevní parazit	Typ	Sekvence
<i>S. muris</i>	Forward primer	5'-CGCGGTAATTCCATCACTGA-3'
	Reverse primer	5'-GGCGGCTACGAGCGTTTTA-3'
	TaqMan probe	6FAM-5'-TTCGGCTGAGCACTC-3'-BHQ-1
<i>T. muris</i>	Forward primer	5'-CGACAAGTTCGATCTTTGAATGC-3'
	Reverse primer	5'-CCATATATGCGTGTCAAAGCAGAA-3'
	TaqMan probe	6FAM-5'-TATTGCGCGCCGTCG-3'-BHQ-1
<i>G. muris</i>	Forward primer	5'-GACGGCTCGGTACAACG-3'
	Reverse primer	5'-CTCTTGAGCACTCGTCTTGG-3'
	TaqMan probe	6FAM-5'-ACCGGGGGTGAAGGCTAGACGG-3'-BHQ-1

Primery jsou specifické a ohraničují fragmenty DNA o velikosti 63 bp pro *S. muris*, 65 bp pro *T. muris* a 89 bp pro *G. muris*.

Složení reakční směsi pro jeden vzorek pro TaqMan real-time PCR je uveden v následující tabulce (tab. 2). Pro každou reakci byla použita negativní kontrola, tedy neobsahovala žádnou DNA, ostatní složky směsi byly zachovány ve stejných objemech.

**Tabulka 2: Složení reakční směsi pro real-time PCR**

Reagencie	Objem (μl)
Master Mix Light Cycler 480 probes master (Roche, CZ)	7
PCR H <sub>2</sub> O Light Cycler 480 probes master (Roche, CZ)	1,2
Forward primer o koncentraci 10 μM (Generi biotech, CZ)	0,3
Reverse primer o koncentraci 10 μM (Generi biotech, CZ)	0,3
TaqMan probe o koncentraci 10 μM (Generi biotech, CZ)	0,2
DNA templát	1
<b>Celkový objem (μl)</b>	<b>10</b>

Reakce byla provedena se změnou teplot 1,6 °C/s a v 45 cyklech (tzn. opakování fází 2–3 45x dle tab. 3). Teploty a trvání jednotlivých fází jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 3).

---

**Tabulka 3: Reakční cyklus pro TaqMan real-time PCR**

	<b>Fáze</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas</b>
<b>1.</b>	Hold stage	95	10 minut
<b>2.</b>	Denaturace	95	15 vteřin
<b>3.</b>	Annealing	57	1 minuta

Pro stanovení počtu kopií DNA v templátu se využívají standardy o přesně známe koncentraci. Pro patogeny *S. muris*, *T. muris* a *G. muris* nebyly k dispozici standardy, proto byla použita metoda klonování (viz dále) pro získání standardů o přesně známe koncentraci, které byly dále využity pro vytvoření ředících řad a následně standardních křivek. Vyzolované pozitivní vzorky (na jednotlivé parazity) nebylo vhodné použít pro ředící řadu, jelikož neobsahují pouze DNA jednotlivých parazitů, ale i další DNA – není tedy známa přesná koncentrace kopií DNA pro jednotlivé parazity.

Pro vytvoření ředící řady a získání standardní křivky byly použity standardy – izoláty plazmidů, do kterých byly vloženy fragmenty DNA pomocí metody klonování. Získaný standard pro *S. muris* měl počáteční koncentraci 330 ng/μl, standard pro *T. muris* měl počáteční koncentraci 94 ng/μl a standard pro *G. muris* měl počáteční koncentraci 166 ng/μl. Koncentrace standardů byla změřena na spektrofotometru NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA).

Standardy byly rozředěny pomocí desítkového ředění do ředící řady v poměru 18:2 – 18 μl Ultra H<sub>2</sub>O : 2 μl DNA templátu. Jednotlivé ředící řady byly analyzovány metodou TaqMan real-time PCR při použití primerů a sond uvedených v tab. 1. Za pomoci ředící řady standardů byly vytvořeny standardní křivky.

Specificita jednotlivých esejí byla otestována pomocí 9 izolátů plazmidové DNA připravených klonováním pro různé druhy parazitů. Počáteční koncentrace je uvedena v tab. 4. Izoláty byly naředěny 1:9 DEPC H<sub>2</sub>O.

---

**Tabulka 4: Izoláty plazmidové DNA použité pro testování specifity**

<b>Izoláty plazmidové DNA</b>	<b>Koncentrace (ng/μl)</b>
<i>Spironucleus muris</i>	394
<i>Cryptosporidium</i> spp.	249
<i>Tritrichomonas muris</i>	236
<i>Giardia muris</i>	215
<i>Myobia musculi</i>	162
<i>Syphacia obvelata</i>	214
<i>Chilomastix</i> spp.	293
<i>Hexamastix</i> spp.	276
<i>Eimeria</i> spp.	165
<i>Syphacia muris</i>	169

Pro verifikaci metody a porovnání bylo použito 22 izolátů DNA z bukálních stěrů, biopsií ze střevní tkáně a exkrementů. Vzorky byly získány z oblastí předpokládaného výskytu *S. muris*, *T. muris* a *G. muris*.

### **4.3 Klonování**

Pro patogeny *S. muris*, *T. muris* a *G. muris* byla použita metoda klonování pro získání standardů o přesně známé koncentraci, které byly dále využity pro vytvoření ředících řad a následně standardních křivek. Pro tento účel byly využity plazmidové vektory TOPO TA Cloning®Kit pCR®4-TOPO®Vector (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) vložené do bakterie *Escherichia coli*.

#### **4.3.1 Hot start PCR**

Po izolaci DNA bylo potřeba získat fragment DNA, který se vkládal do plazmidu *E. coli*. Získání a amplifikace fragmentu byla provedena za pomoci metody hot start PCR. Pro amplifikaci DNA byl použit termocykler Biometra TAdvanced 60G (Analytik Jena, Německo). Primery pro hot start PCR byly použity stejné jako pro real-time PCR (viz tab. 1). Složení reakční směsi hot start PCR pro každý vzorek je popsáno v následující tabulce (tab. 5).



**Tabulka 5: Složení reakce – Hot start PCR**

Reagencie	Objem (μl)
OneTaq® Hot Start Quick-Load® 2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs, USA)	12,5
PCR Ultra H <sub>2</sub> O (Top-Bio, CZ)	9,5
Forward primer o koncentraci 10 μM (Generi biotech, CZ)	1
Reverse primer o koncentraci 10 μM (Generi biotech, CZ)	1
DNA templát	1
<b>Celkový objem (μl)</b>	<b>25</b>

Pro každou reakci byla použita negativní kontrola, tedy neobsahovala žádnou DNA, ostatní složky směsi byly zachovány ve stejných objemech. Reakční cyklus byl proveden dle následující tabulky (tab. 6). Kroky 2–4 se opakovaly 35x.

**Tabulka 6: Reakční cyklus – Hot start PCR**

Fáze	Teplota (°C)	Čas (minuty)
1. Počáteční denaturace	94	5
2. Denaturace	94	1
3. Annealing	57	1
4. Elongace	68	0,5
5. Závěrečná elongace	68	5
6. Chlazení	4	∞

#### 4.3.2 Vizualizace fragmentů DNA – Elektroforéza

Vizualizace produktů hot start PCR reakce byla provedena za pomoci gelové elektroforézy. Elektroforéza se provedla na 2% agarózovém gelu. 2 % agarózový gel byl připraven smícháním 2 g agarózy a 100 ml 1x TBE pufru (Tris-borátového pufru). Tato směs byla zahřívána, dokud nebyla směs zcela rozpuštěna. Jako interkalační barvivo bylo použito 4 μl Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, USA). Připravený gel byl přelit do držáku gelu s těsněním a hřebínky. Až byl gel zcela ztuhlý, bylo odstraněno těsnění a hřebínky. Dále byl gel přendán do elektroforetické vany. Do jednotlivých vzniklých štěrbin bylo napipetováno 17 μl vzorku. Do první štěrbině byl napipetován velikostí marker – 100 bp DNA ladder (New England BioLabs, USA), aby bylo možné porovnání velikosti fragmentů DNA. Pro separaci bylo použito nastavení na 120 V po dobu 40 minut. Gel byl vyhodnocen za pomoci UV transiluminátoru se snímacím kamerovým systémem InGenius 3 (Syngene,

---

Velká Británie). Vizualizace fragmentů DNA byla provedena z důvodu výběru nejlepšího vzorku.

### **4.3.3 Přečištění PCR produktu z gelu**

K přečištění byl použit komerčně dostupný kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL, Německo). Jedná se o přečištění PCR produktu za pomoci kolonek – podobné jako pro izolaci DNA.

Z agarózového gelu byly vyříznuty pomocí skalpelu gelové bločky s obsahem fragmentu DNA a byly umístěny do mikrozkušavek typu Eppendorf. Do mikrozkušavek ke gelu byl přidán NTI roztok z kitu v poměru 1:2 (na 100 mg gelu bylo použito 200 µl NTI) a dále se rozpustil gel s NTI roztokem v termobloku při 50 °C po dobu 10 minut a s třepáním při rychlosti 500 rpm. Po 10 minutách byl gel kompletně rozpuštěn. Rozpuštěné gely s fragmenty DNA byly přemístěny do kolonek se sběrnou zkumavkou a byly centrifugovány v centrifuze Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Německo) po dobu 1 minuty při 11 000 otáčkách/minutu. Ze sběrných zkumavek byl odstraněn obsah a přidalo se do kolonky 700 µl NT3 pufru. Opět proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při 11 000 otáčkách/minutu a byl odstraněn obsah ze sběrných zkumavek. Krok centrifugace (po dobu 1 minuty při 11 000 otáčkách/minutu) byl zopakován pro odstranění zbytků NT3 pufru, který obsahuje alkohol a jehož zůstatek by mohl ovlivnit enzymatické reakce. Kolonky byly přemístěny do elučnic 1,5ml mikrozkušavek a byl kladen důraz na to, aby kolonky nepřišly do styku s obsahem ve sběrných zkumavkách. Dále bylo přidáno 30 µl NE pufru předehřátého na 70 °C přímo na membránu a byla provedena inkubace při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Při centrifugaci po dobu 1 minuty při 11 000 otáčkách/minutu byl do elučnic mikrozkušavky uvolněn přečištěný PCR produkt.

### **4.3.4 Klonování TOPO**

Ke klonování byl použit kit TOPO TA Cloning®Kit pCR®4-TOPO®Vector (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA).

V prvním kroku klonování byla připravena klonovací reakční směs obsahující pro každý DNA fragment (přečištěný PCR produkt) 0,5 µl Salt solution a 0,5 µl TOPO vector. Tato směs byla rozpipetována po 1 µl do 0,2ml mikrozkušavek a do každé byl přidán přečištěný PCR produkt o objemu 2 µl. Dále bylo provedeno

---

krátké zvortexování a stočení a inkubace při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Těmito kroky se provedlo zabudování fragmentu DNA (inzertu) do vektoru.

V dalším kroku byly použity buňky Mach1™ T1 Phage-Resistant Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA). K buňkám *E. coli*, které se umístily na led, bylo přidáno 2 µl klonovací reakční směsi a směs byla jemně promíchána. Po promíchání byla směs ihned umístěna na led a nechala se inkubovat 30 minut. Následně byl proveden tepelný šok v termobloku při 42 °C po dobu 30 vteřin. Dále byly zkumavky okamžitě přeneseny na led po dobu 1 minuty. Následujícím krokem bylo přidání 250 µl S.O.C. média (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) vytemperovaného na pokojovou teplotu. Zkumavky byly třepány v třepačce po dobu 1 hodiny při 37 °C.

Jako živné médium pro růst bakterií *E. coli* s inzertem byl použit LB agar s ampicillinem (AMP) Fast-Media® Amp Agar (InvivoGen, USA). Obsah sáčku určený pro přípravu LB agaru s AMP se přesypal do čisté skleněné nádoby o objemu 500 ml a přidalo se 200 ml destilované vody. Mikrovlnná trouba se nastavila na střední ohřev a provedlo se zahřívání po dobu 2–3 minut, dokud se nezačaly objevovat bubliny. Dále bylo médium promícháno a znovu zahříváno po dobu 30 vteřin. Médium se znovu promíchalo. Poté bylo živné médium rozděleno do Petriho misek v biohazard boxu pro zajištění sterility. Živné médium se nechalo dostatečně ztuhnout. Pro každý vzorek (S.O.C. médium s buňkami *E. coli* s vektorem) byly připraveny 2 Petriho misky s LB agarem s AMP. Na každou Petriho misku s LB agarem s AMP bylo nanášeno 70 µl vzorku, který byl rovnoměrně rozetřen. Takto připravené Petriho misky byly inkubovány bez přístupu světla otočené dnem vzhůru při 37 °C do druhého dne (cca 18 hodin).

Druhý den bylo z každé Petriho misky vybráno po 2 koloniích. Každá kolonie byla přenesena do tekutého média (4 ml LB liquid médium s AMP ve falkonách). Falkony se umístily do třepačky téměř ve vodorovné poloze s pootevřenými víčky. Takto byly kultivovány po dobu 24 hodin a při 37 °C.

Třetí den byly falkony centrifugovány po dobu 5 minut při 3 000 otáčkách/minutu. Médium se odlilo, aby zůstal jen pelet. K izolaci plazmidu byl použit kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, USA). Pelet byl resuspendován v 250 µl resuspendačního roztoku a přepipetován do 1,5ml mikrozkuvek. Do mikrozkuvek bylo přidáno 250 µl lyzačního roztoku

a mikrozkušavky byly promíchány otočením dnem vzhůru (4–6x), dokud se obsah mikrozkušavek nestal viskózním a čirým. Poté se k obsahu mikrozkušavek přidalo 350 µl neutralizačního roztoku a opět bylo provedeno promíchání otočením mikrozkušavek dnem vzhůru (4–6x). Dále byla provedena centrifugace po dobu 5 minut při 12 000 otáčkách/minutu. Supernatant byl přepipetován do GeneJET spin kolonek se sběrnou zkumavkou a následně byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 12 000 otáčkách/minutu a poté byl odstraněn obsah ze sběrných zkumavek. V následujícím kroku bylo do kolonky přidáno 500 µl promývacího roztoku a opět byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 12 000 otáčkách/minutu a odstranění obsahu sběrné zkumavky. Tento promývací krok byl zopakován. Následně bylo provedeno stočení „na sucho“ po dobu 1 minuty při 12 000 otáčkách/minutu. Kolonka byla vyjmuta ze sběrné zkumavky a byl kladen důraz na to, aby nepřišla do kontaktu s obsahem ve sběrné zkumavce. Kolonka se umístila do 1,5ml eluční mikrozkušavky a přímo na membránu se aplikovalo 50 µl elučního pufru přehřátého na 70 °C. Poté byla provedena inkubace při pokojové teplotě po dobu 2 minut. Na závěr se provedla centrifugace po dobu 2 minut při 12 000 otáčkách/minutu.

Kontrola výsledku klonování byla provedena pomocí metody hot start PCR (viz výše). Pro hot start PCR se použily prvně primery M13, pomocí nichž bylo zjištěno, zda izolát získaný předchozími kroky obsahuje plazmid nebo nikoliv. Pro primery M13 byl reakční průběh dle následující tabulky (tab. 7). Složení reakční směsi a počet cyklů byl zachován.

**Tabulka 7: Reakční cyklus – Hot start PCR pro primery M13**

	<b>Fáze</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas (minuty)</b>
<b>1.</b>	Počáteční denaturace	94	5
<b>2.</b>	Denaturace	94	1
<b>3.</b>	Annealing	55	1
<b>4.</b>	Elongace	68	1
<b>5.</b>	Závěrečná elongace	68	5
<b>6.</b>	Chlazení	4	∞

Následně byla provedena hot start PCR se specifickými primery pro DNA fragmenty (zvláště pro *S. muris*, *T. muris* a *G. muris*, primery jsou uvedené v tab. 1), pomocí kterých bylo provedeno získání DNA fragmentů pro klonování. Průběh reakce hot

---

start PCR byl dle tab. 6. Produkty hot start PCR byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (viz výše). Izoláty bez plazmidu a bez požadovaného DNA fragmentu byly vyřazeny. Dále byla změřena koncentrace plazmidové DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) a byly vybrány nejlepší izoláty vhodné pro sestavení ředící řady pro real-time PCR. Vzorke plasmidové DNA byly následně uchovány při -20 °C.

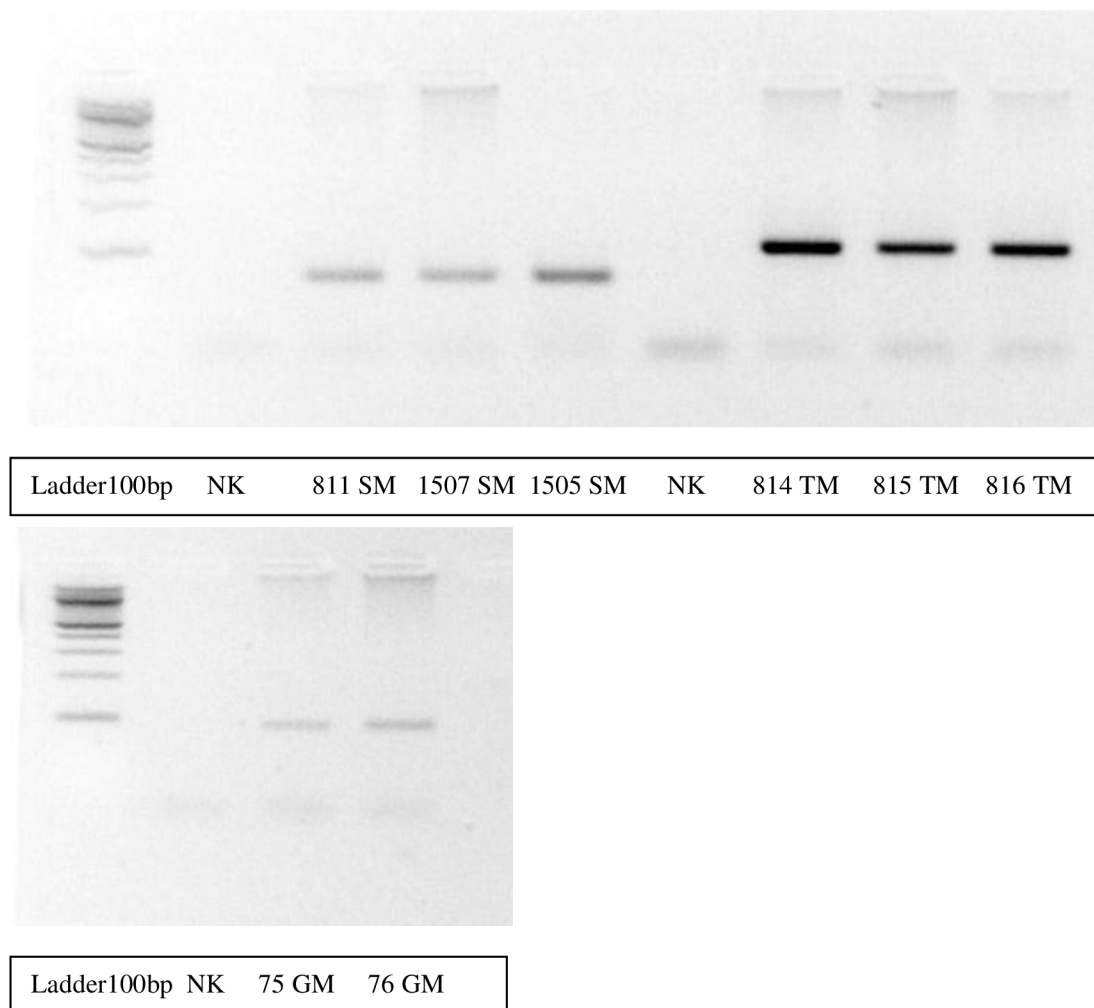
---

## 5 Výsledky

### 5.1 Klonování – standardy pro real-time PCR

Pomocí klonování byly získány standardy pro sestavení ředící řady potřebné pro absolutní kvantifikaci metody real-time PCR.

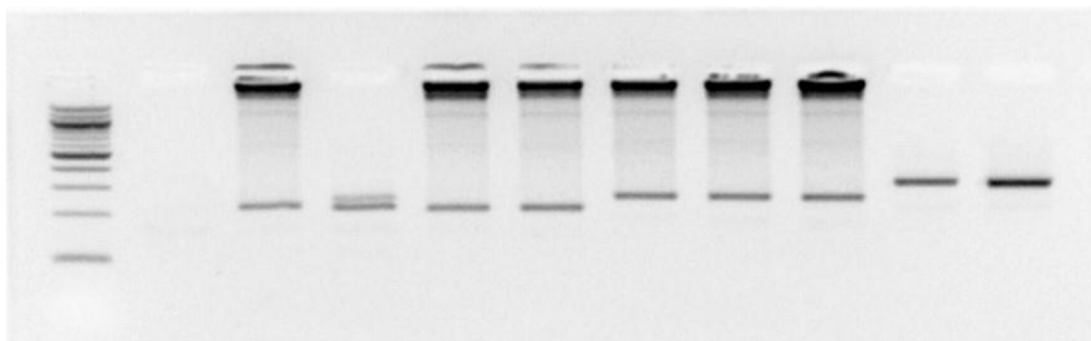
Pro klonování byly získány fragmenty DNA pomocí metody hot start PCR s primery uvedenými v tab. 1. Vizualizace PCR produktu byla provedena pomocí gelové elektroforézy (obr. 4).



**Obrázek 4: Vizualizace PCR produktů pomocí gel. elektroforézy – *S. muris*, *T. muris*, *G. muris***

Pro klonování byly vybrány PCR produkty 811 SM a 1505 EX SM pro DNA fragment *S. muris*, 814 TM a 816 TM pro DNA fragment *T. muris* a 75 GM a 76 GM pro DNA fragment *G. muris*. Označení PCR produktů SM, TM a GM jsou zkratky pro jednotlivé parazity – tj. SM jako *S. muris*, TM jako *T. muris* a GM jako *G. muris*.

Kontrola výsledku klonování byla provedena pomocí metody hot start PCR, která proběhla prvně s primery M13, pomocí nichž byl zjištěn obsah plazmidu. Produkty hot start PCR byly opět vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (obr. 5).

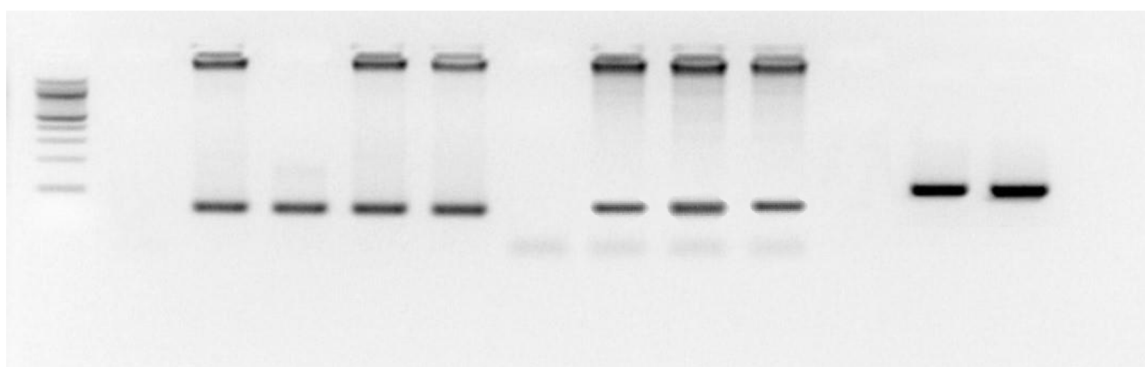


Ladder100bp NK 811 SM 811 SM 2x 1505 SM 814 TM 816 TM 816 TM 75 GM 76 GM

**Obrázek 5: Vizualizace PCR produktů pomocí gelové elektroforézy – primery M13**

Dle výsledku gelové elektroforézy všechny testované vzorky obsahují plazmidovou DNA.

Následně byla provedena hot start PCR se specifickými primery pro DNA fragmenty (zvláště pro *S. muris*, *T. muris* a *G. muris*), pomocí kterých proběhlo získání DNA fragmentů pro klonování. Opět byly produkty hot start PCR vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (obr. 6).



L.100bp NK 811 SM 811 SM 2x 1505 SM NK 814 TM 816 TM 816 TM NK 75 GM 76 GM

**Obrázek 6: Vizualizace PCR produktů pomocí gelové elektroforézy – specifické primery**

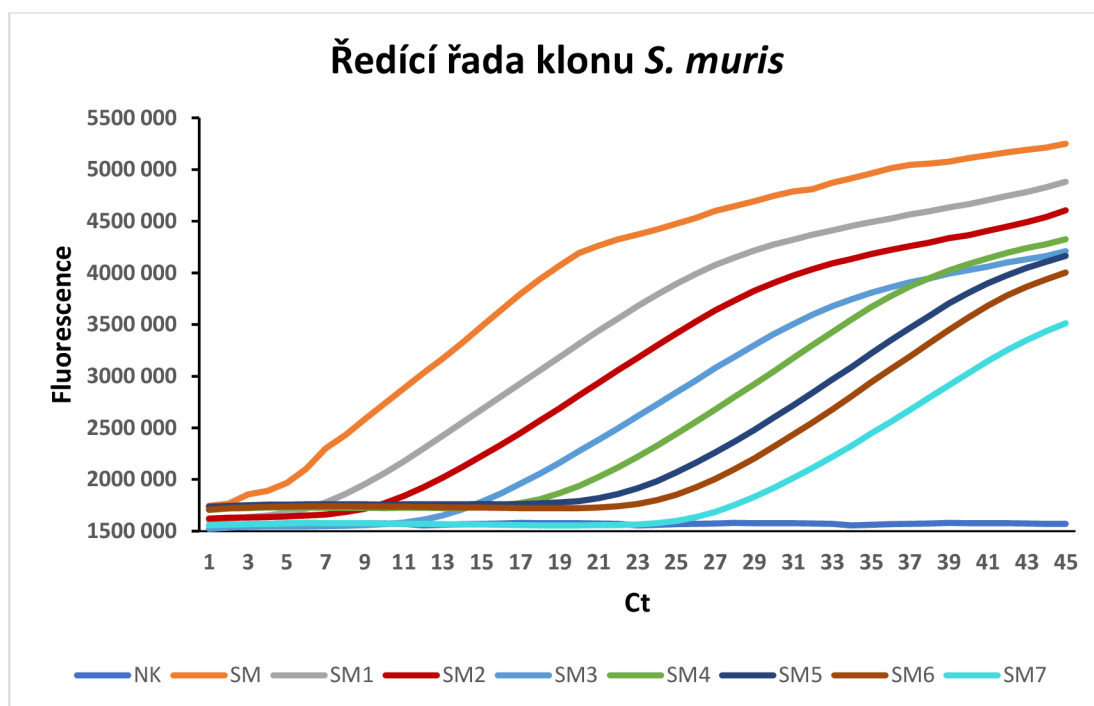
Dle výsledku gelové elektroforézy všechny testované vzorky obsahují inzertovaný fragment DNA. Klonování proběhlo úspěšně a u vzorků byla změřena koncentrace DNA (viz tab. 8) a byly vybrány vzorky pro sestavení ředící řady (viz dále).

Tabulka 8: Koncentrace DNA klonů

Pořadí	Parazit	Původní vzorek	Koncentrace (ng/μl)
1	<i>S. muris</i>	811 stěr	394
2	<i>S. muris</i>	1505 EX	350
3	<i>S. muris</i>	1505 EX	330
4	<i>T. muris</i>	814 stěr	94
5	<i>T. muris</i>	816 stěr	236
6	<i>T. muris</i>	816 stěr	181
7	<i>G. muris</i>	76 stěr	178
8	<i>G. muris</i>	76 stěr	166
9	<i>G. muris</i>	75 stěr	215

## 5.2 Real-time PCR – *Spironucleus muris*

Senzitivita a účinnost detekční metody real-time PCR pro *S. muris* byla testována pomocí ředící řady klonu *S. muris*. Obr. 7 znázorňuje amplifikační křivky ředící řady klonu *S. muris* (ozn. jako SM) o koncentraci 330 ng/μl. Koncentrace DNA v ředěních je následující: SM1 = 33,0 ng/μl, SM2 = 3,3 ng/μl, SM3 =  $3,3 \times 10^{-1}$  ng/μl, SM4 =  $3,3 \times 10^{-2}$  ng/μl, SM5 =  $3,3 \times 10^{-3}$  ng/μl, SM6 =  $3,3 \times 10^{-4}$  ng/μl a SM7 =  $3,3 \times 10^{-5}$  ng/μl.



Obrázek 7: Amplifikační křivky ředící řady klonu *S. muris*



Nejnižší koncentrace DNA, při jejíž amplifikaci fluorescence překročila threshold, byla  $3,3 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ l (tj. ředění SM7) a práh detekce byl překročen ve 26. cyklu. Detekční limit, tj. minimální koncentrace cílové DNA, která musí být přítomna ve vzorku, aby došlo k detekovatelné amplifikaci, byl stanoven právě na tuto koncentraci.

V dalším kroku byl vypočítán počet kopií DNA/ $\mu$ l pro klon *S. muris* o koncentraci DNA 330 ng/ $\mu$ l podle následujícího vzorce (1). Počet kopií DNA/ $\mu$ l je potřeba k sestavení standardní křivky, pomocí které je stanovena účinnost reakce real-time PCR.

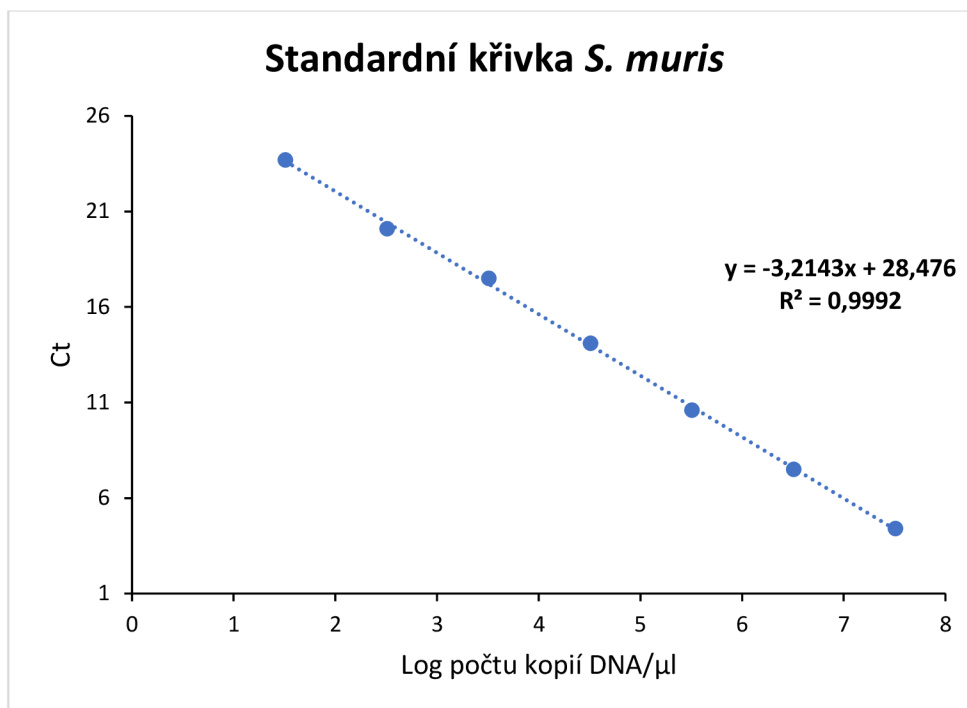
$$\frac{\text{koncentrace DNA [ng/\mu l]} * 6,022 * 10^{23}}{\text{délka templátové DNA [bp]} * 1 * 10^9 * 660} = \text{počet kopií DNA/\mu l} \quad (1)$$

$$\frac{330 * 6,022 * 10^{23}}{4700000 * 1 * 10^9 * 660} = 64063890 = 6,4 * 10^7 \text{ kopií DNA/\mu l}$$

Z výsledků ředící řady a výpočtu počtu kopií DNA/ $\mu$ l byla sestavena tab. 9, která byla dále využita pro sestavení standardní křivky. Z hodnot tab. 9 byl sestaven graf (obr. 8).

**Tabulka 9: Ředící řada klonu *S. muris* – sestavení standardní křivky**

Ředění	Počet kopií DNA/ $\mu$ l	Log počtu kopií DNA/ $\mu$ l	Ct
1000000x	$6,4 \times 10^1$	1,81	25,5
100000x	$6,4 \times 10^2$	2,81	23,9
10000x	$6,4 \times 10^3$	3,81	22,0
1000x	$6,4 \times 10^4$	4,81	18,2
100x	$6,4 \times 10^5$	5,81	12,9
10x	$6,4 \times 10^6$	6,81	9,2
1x	$6,4 \times 10^7$	7,81	5,8



**Obrázek 8: Standardní křivka ředící řady klonu *S. muris***

Pro výpočet účinnosti reakce real-time PCR byl použit následující vzorec (2). Hodnota účinnosti reakce byla vypočítána ze sklonu standardní křivky (tj. slope), který byl získán z grafu (obr. 6).

$$E = 10^{(-1/slope)} \quad (2)$$

$$slope = -3,4857$$

$$E = 10^{(-1/-3,4857)}$$

$$E = 1,93592$$

$$\%E = (E - 1) * 100$$

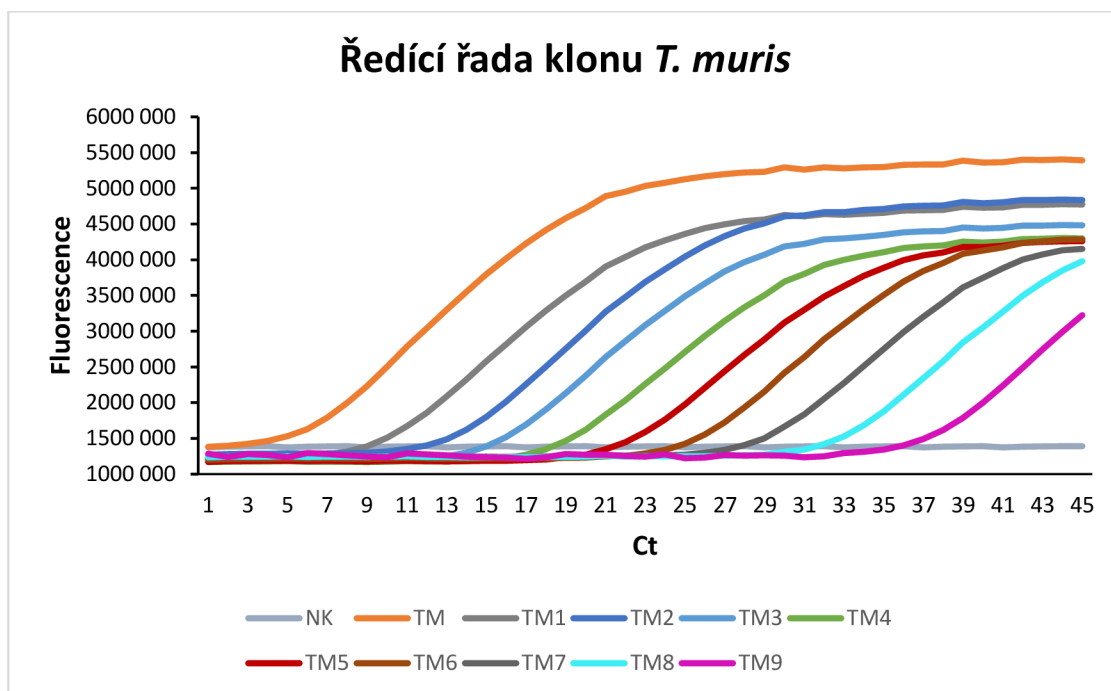
$$\%E = 93,6 \%$$

Hodnota účinnosti reakce byla stanovena na 93,6 %. Hodnota korelačního koeficientu lineární regrese (tj.  $R^2$ ) pro odhad spolehlivosti reakce byla stanovena na 0,9746. Spolehlivost reakce je tedy poměrně vysoká.

Testování specificity proběhlo pomocí 9 příbuzných parazitů. K amplifikaci DNA došlo pouze u izolátů DNA *S. muris*. Nedošlo k amplifikaci DNA ani u velice příbuzných organismů jako je *T. muris* a *G. muris*. Proto byly primery vyhodnoceny jako specifické pro parazita *S. muris*.

### 5.3 Real-time PCR – *Tritrichomonas muris*

Senzitivita a účinnost detekční metody real-time PCR pro *T. muris* byla testována pomocí ředící řady klonu. Obr. 9 znázorňuje amplifikační křivky ředící řady klonu *T. muris* (ozn. jako TM) o koncentraci 94 ng/μl. Koncentrace DNA v ředěních je následující: TM1 = 9,4 ng/μl, TM2 = 9,4×10<sup>-1</sup> ng/μl, TM3 = 9,4×10<sup>-2</sup> ng/μl, TM4 = 9,4×10<sup>-3</sup> ng/μl, TM5 = 9,4×10<sup>-4</sup> ng/μl, TM6 = 9,4×10<sup>-5</sup> ng/μl, TM7 = 9,4×10<sup>-6</sup> ng/μl, TM8 = 9,4×10<sup>-7</sup> ng/μl a TM9 = 9,4×10<sup>-8</sup> ng/μl.



Obrázek 9: Amplifikační křivky ředící řady klonu *T. muris*

Nejnižší koncentrace DNA, při jejíž amplifikaci fluorescence překročila threshold, byla 9,4×10<sup>-8</sup> ng/μl (tj. ředění TM9) a práh detekce byl překročen ve 35. cyklu. Detekční limit byl stanoven na tuto koncentraci.

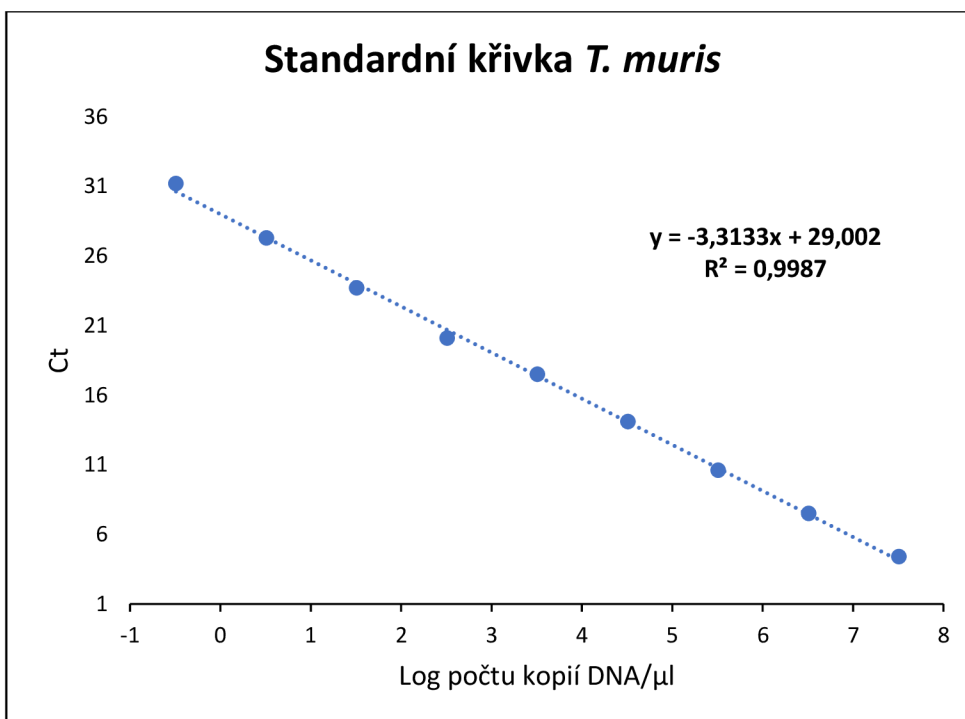
Dále byl vypočítán počet kopií DNA/μl pro klon *T. muris* o koncentraci DNA 94 ng/μl podle vzorce 1 (viz výše).

$$\frac{\text{koncentrace DNA [ng/}\mu\text{l]} * 6,022 * 10^{23}}{\text{délka templatové DNA [bp]} * 1 * 10^9 * 660} = \text{počet kopií DNA/}\mu\text{l}$$
$$\frac{94 * 6,022 * 10^{23}}{4700000 * 1 * 10^9 * 660} = 18248502 = 1,8 * 10^7 \text{ kopií DNA/}\mu\text{l}$$

Z výsledků ředící řady a výpočtu počtu kopií DNA/ $\mu$ l byla sestavena tab. 10, která byla dále využita pro sestavení standardní křivky. Z hodnot tab. 10 byl sestaven graf (obr. 10).

**Tabulka 10: Ředící řada klonu *T. muris* – sestavení standardní křivky**

Ředění	Počet kopií DNA/ $\mu$ l	Log počtu kopií DNA/ $\mu$ l	Ct
1000000000x	$1,8 \times 10^{-2}$	-1,74	34,7
100000000x	$1,8 \times 10^{-1}$	-0,74	30,9
10000000x	$1,8 \times 10^0$	0,26	27,0
1000000x	$1,8 \times 10^1$	1,26	23,6
100000x	$1,8 \times 10^2$	2,26	19,9
10000x	$1,8 \times 10^3$	3,26	16,9
1000x	$1,8 \times 10^4$	4,26	13,4
100x	$1,8 \times 10^5$	5,26	11,5
10x	$1,8 \times 10^6$	6,26	8,0
1x	$1,8 \times 10^7$	7,26	4,5



**Obrázek 10: Standardní křivka ředící řady klonu *T. muris***

Pro výpočet účinnosti reakce real-time PCR byl použit vzorec (2). Hodnota účinnosti reakce byla vypočítána ze sklonu standardní křivky (tj. slope).

$$E = 10^{(-1/slope)}$$

---

$$\text{slope} = -3,2921$$

$$E = 10^{(-1/-3,2921)}$$

$$E = 2,01260$$

$$\%E = (E - 1) * 100$$

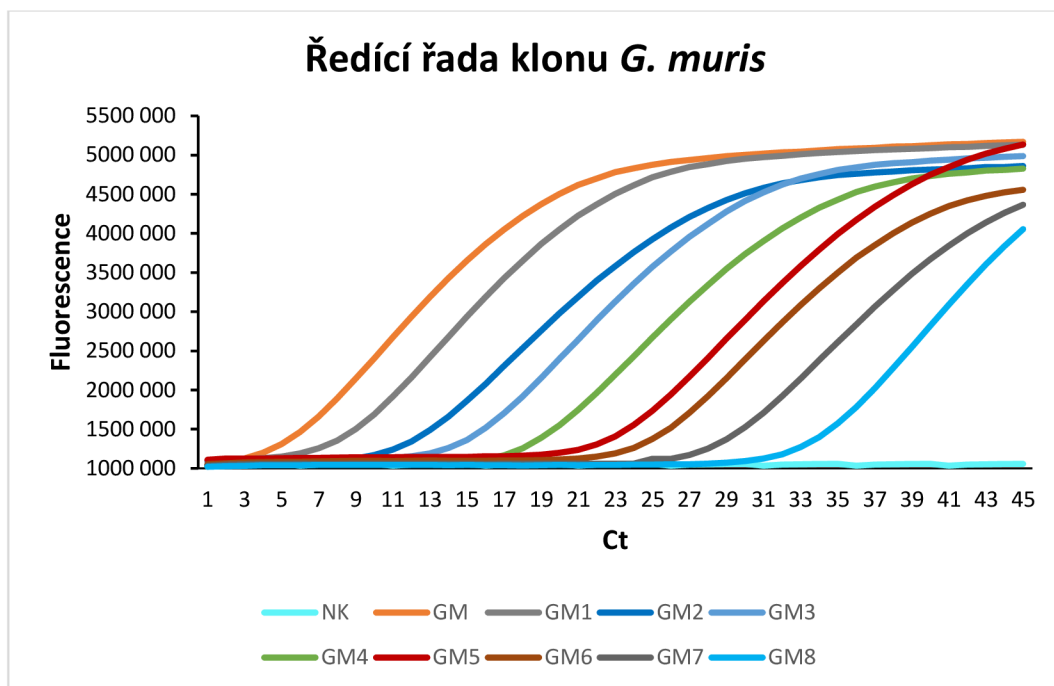
$$\%E = 101 \%$$

Hodnota účinnosti reakce byla stanovena na 101 %. Hodnota korelačního koeficientu lineární regrese (tj.  $R^2$ ) pro odhad spolehlivosti reakce byla stanovena na 0,9965. Spolehlivost reakce je tedy vysoká.

Testování specificity proběhlo pomocí 9 příbuzných parazitů. K amplifikaci DNA došlo pouze u izolátů DNA *T. muris*. Nedošlo k amplifikaci DNA ani u velice příbuzných organismů jako je *S. muris* a *G. muris*. Proto byly primery vyhodnoceny jako specifické pro parazita *T. muris*.

#### **5.4 Real-time PCR – *Giardia muris***

Senzitivita a účinnost detekční metody real-time PCR pro *G. muris* byla testována pomocí ředící řady klonu *G. muris*. Obr. 11 znázorňuje amplifikační křivky ředící řady klonu *G. muris* (ozn. jako GM) o koncentraci 166 ng/μl. Koncentrace DNA v ředěních je následující: GM1 = 16,6 ng/μl, GM2 = 1,66 ng/μl, GM3 =  $1,66 \times 10^{-1}$  ng/μl, GM4 =  $1,66 \times 10^{-2}$  ng/μl, GM5 =  $1,66 \times 10^{-3}$  ng/μl, GM6 =  $1,66 \times 10^{-4}$  ng/μl, GM7 =  $1,66 \times 10^{-5}$  ng/μl a GM8 =  $1,66 \times 10^{-6}$  ng/μl.



**Obrázek 11: Amplifikační křivky ředící řady klonu *G. muris***

Nejnižší koncentrace DNA, při jejíž amplifikaci fluorescence překročila threshold, byla  $1,66 \times 10^{-6}$  ng/ $\mu$ l (tj. ředění GM8) a práh detekce byl překročen ve 32. cyklu. Detekční limit byl stanoven na tuto koncentraci.

V dalším kroku byl vypočítán počet kopií DNA/ $\mu$ l pro klon *G. muris* o koncentraci DNA 166 ng/ $\mu$ l podle vzorce 1 (viz výše).

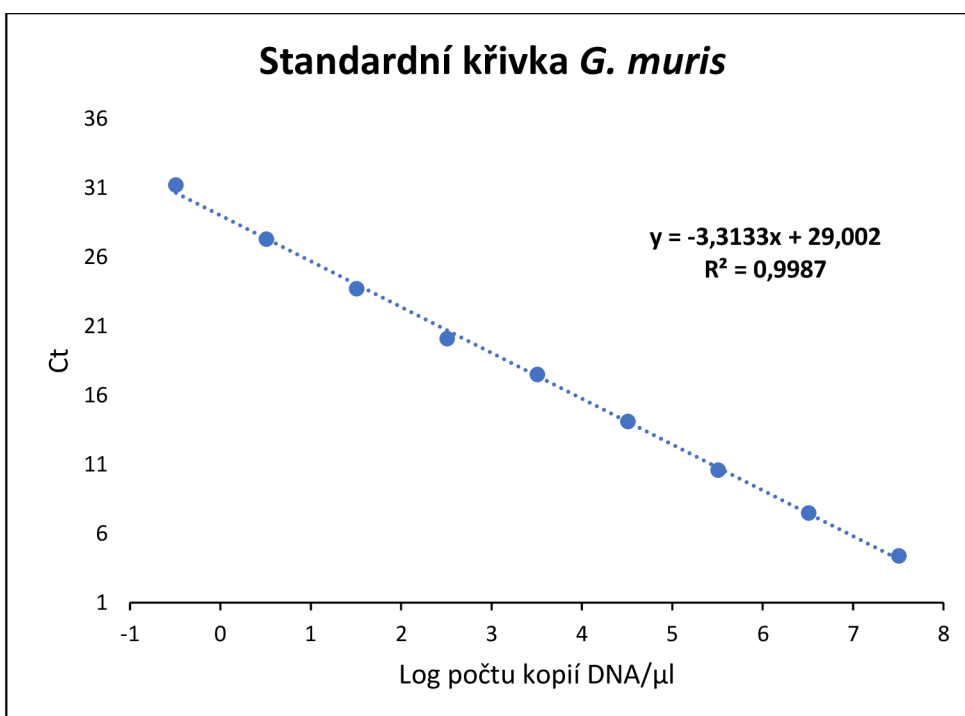
$$\frac{\text{koncentrace DNA [ng/\mu l]} * 6,022 * 10^{23}}{\text{délka templátové DNA [bp]} * 1 * 10^9 * 660} = \text{počet kopií DNA/\mu l}$$

$$\frac{166 * 6,022 * 10^{23}}{4700000 * 1 * 10^9 * 660} = 32226078 = 3,2 * 10^7 \text{ kopií DNA/\mu l}$$

Z výsledků ředící řady a výpočtu počtu kopií DNA/ $\mu$ l byla sestavena tab. 11, která byla dále využita pro sestavení standardní křivky. Z hodnot tab. 11 byl sestaven graf (obr. 12).

Tabulka 11: Ředící řada klonu *G. muris* – sestavení standardní křivky

Ředění	Počet kopií DNA/ $\mu$ L	Log počtu kopií DNA/ $\mu$ L	Ct
100000000x	$3,2 \times 10^{-1}$	-0,49	31,2
10000000x	$3,2 \times 10^0$	0,51	27,3
1000000x	$3,2 \times 10^1$	1,51	23,7
100000x	$3,2 \times 10^2$	2,51	20,1
10000x	$3,2 \times 10^3$	3,51	17,5
1000x	$3,2 \times 10^4$	4,51	14,1
100x	$3,2 \times 10^5$	5,51	10,6
10x	$3,2 \times 10^6$	6,51	7,5
1x	$3,2 \times 10^7$	7,51	4,4



Obrázek 12: Standardní křivka ředící řady klonu *G. muris*

Pro výpočet účinnosti reakce real-time PCR byl použit vzorec 2. Hodnota účinnosti reakce byla vypočítána ze sklonu standardní křivky (tj. slope).

$$E = 10^{(-1/slope)}$$

$$slope = -3,3133$$

$$E = 10^{(-1/-3,3133)}$$

$$E = 2,00361$$

$$\%E = (E - 1) * 100$$

$$\%E = 100 \%$$

---

Hodnota účinnosti reakce byla stanovena na 100 %. Hodnota korelačního koeficientu lineární regrese (tj.  $R^2$ ) pro odhad spolehlivosti reakce byla stanovena na 0,9987. Spolehlivost reakce je tedy vysoká.

Testování specifity proběhlo pomocí 9 příbuzných parazitů. K amplifikaci DNA došlo pouze u izolátů DNA *G. muris*. Nedošlo k amplifikaci DNA ani u velice příbuzných organismů jako je *S. muris* a *T. muris*. Proto byly primery vyhodnoceny jako specifické pro parazita *G. muris*.

### **5.5 Verifikace real-time PCR a porovnání druhů biologických materiálů**

Verifikace u parazitů *S. muris*, *T. muris* a *G. muris* byla provedena na 22 izolátech DNA z různých biologických materiálů – bukálních stěrů, biopsií střevní tkáně a exkrementů. Nález daného parazita ve vzorku byl zaznamenán jako Ct hodnota (viz. tab. 12). Při negativním výsledku bylo zaznamenáno -.

Podle tab. 12 proběhlo také porovnání vhodnosti různých druhů biologických materiálů pro detekci parazitů *S. muris*, *T. muris* a *G. muris* pomocí metody TaqMan real-time PCR – tzn. byly porovnány výsledky TaqMan real-time PCR více druhů biologických materiálů u jednoho laboratorního hlodavce. Pro detekci parazita *S. muris* je dle výsledků tab. 12 považován za nejvhodnější biologický materiál exkrement. Pro detekci parazitů *T. muris* a *G. muris* je nejvhodnější biologický materiál bukální stěr.

V nejvíce vzorcích byl nalezen parazit *T. muris* – 8 z 22. *S. muris* byl nalezen ve 3 vzorcích z 22. Nejméně se vyskytující parazit v testovaných vzorcích byl *G. muris*. U parazitů *S. muris* a *G. muris* je testovaná prevalence u zkoumaných laboratorních hlodavců poměrně nízká. U vzorků 75 a 76 byla zjištěna pozitivita na 2 parazity současně – na *T. muris* a *G. muris*. *S. muris* byl detekován pouze ve vzorcích exkrementů, *T. muris* a *G. muris* byli detekováni ve vzorcích bukálních stěrů.



Tabulka 12: Verifikace pro *S. muris*, *T. muris* a *G. muris*

Vzorek	<i>S. muris</i>	<i>T. muris</i>	<i>G. muris</i>
	Ct	Ct	Ct
811 stěr	25	-	-
812 stěr	-	28	-
813 stěr	-	-	-
814 stěr	-	20	-
815 stěr	-	22	-
816 stěr	-	22	-
817 stěr	-	30	-
818 stěr	-	32	-
310 EX	-	-	-
310 stěr	-	-	-
1505 EX	25	-	-
608 stěr	-	-	-
614 stěr	-	-	-
1507 střevo	-	-	-
1505 střevo	-	-	-
1677 stěr	-	-	-
1507 EX	24	-	-
1502 B EX	-	-	-
493 střevo	-	-	-
EKT BOUB stěr	-	-	-
75 stěr	-	32	26
76 stěr	-	21	22
<b>22</b>	<b>3 z 22</b>	<b>8 z 22</b>	<b>2 z 22</b>
<b>%</b>	<b>13,6</b>	<b>36,4</b>	<b>9,1</b>

---

## 6 Diskuse

Střevní parazité mohou způsobit velmi nepříjemná onemocnění (Escalante et al., 2016). Vyčerpání živin je nežádoucím důsledkem gastrointestinálních parazitárních infekcí. Vyčerpání vody a elektrolytů je nebezpečím u jedinců s těžkým průjmem. Těžký a dlouhotrvající průjem může jedince ohrožovat na životě (Burr et al., 2012; Whary et al., 2015; Garcia et al., 2018). Proto je důležitá jejich včasná detekce pro zahájení správné léčby (Escalante et al., 2016).

V polovině 80. let 20. století byly provedeny průzkumy, které ukázaly, že míra prevalence *S. muris* mezi domácími myšimi kmeny přesáhla 60 % (Fox et al., 2002; Voros et al., 2021). Tato prevalence byla vyšší než prevalence zjištěná u volně žijících hlodavců v jiné studii. Nižší senzitivita dříve používaných diagnostických technik mohla podhodnocovat skutečnou prevalenci (Voros et al., 2021). Poslední hodnocení prevalence *S. muris* v roce 2009 ukázalo, že byla detekována v méně než 1 % vzorků laboratorních myší v Severní Americe. Toto hodnocení však bylo založeno na použití testu, který může postrádat citlivost. Proto může být skutečná prevalence vyšší. Tato zjištění zdůrazňují potřebu diagnostických testů pro *S. muris*, které mají vysokou senzitivitu a specificitu (Jackson et al., 2013). Současná prevalence *S. muris* stále není známa (Voros et al., 2021). Dle výsledků této diplomové práce je testovaná prevalence výrazně nižší než dle průzkumu z poloviny 80. let 20. století a další studie, ale je vyšší, než uvádí Jackson et al. (2013) v průzkumu ze Severní Ameriky, kde prevalence byla pouhé 1 %. *T. muris* je poměrně rozšířený střevní prvok u myší (Al-Aboody et al., 2016; Garcia et al., 2018; Zarei et al., 2018; Da Costa et al., 2019). Screening *T. muris* není v zařízeních pro zvířata standardem, proto současná prevalence *T. muris* u laboratorních myší není známa (Escalante et al., 2016; Da Costa et al., 2019). Výsledky výzkumu potvrzují, že *T. muris* je poměrně rozšířený a má vysokou testovanou prevalenci. V současné době není prevalence infekce *G. muris* u laboratorních potkanů a myší známa (Baker, 2006; Whary et al., 2015). Zatímco prevalence *G. muris* u křečka je velmi vysoká (Burr et al., 2012). Testovaná prevalence je dle výsledků diplomové práce nízká.

*S. muris* se nejvíce vyskytuje v čerstvém střevním obsahu a exkrementech (Baker, 2006; Brown a Donnelly, 2012; Voros et al., 2021). V diplomové práci bylo dosaženo stejného výsledku – nejvhodnější biologický materiál pro detekci *S. muris*

---

jsou exkrementy. *T. muris* a *G. muris* se vyskytuje nejvíce ve slepém, tlustém a tenkém střevě myši, potkanů a křečků (Fox et al., 2002; Burr et al., 2012; Whary et al., 2015). Podle výsledků diplomové práce se ovšem parazité *T. muris* a *G. muris* vyskytují i v bukálním stěru, ve střevní tkáni a exkrementech nebyli zachyceni vůbec.

Senzitivita mikroskopie ve srovnání s PCR je daleko menší z hlediska detekce střevních parazitů. Proto je důležitý vývoj molekulárních screeningových metod v kombinaci s mikroskopickými a specializovanými analýzami (Stensvold et al., 2012; Meurs et al., 2017; Garcia et al., 2018; Momčilović et al., 2019; Martínez et al., 2023). Pro střevní parazity se v dnešní době hojně využívá detekce založená na PCR (Verweij, 2014; Whary et al., 2015; Momčilović et al., 2019; Voros et al., 2021). Na rozdíl od klasické PCR umožňuje real-time PCR kvantifikaci amplifikované DNA. Real-time PCR je velmi citlivá metoda a nemusí být následována další vizualizační metodou (Bustin, 2005; Šmarda et al., 2005; Beránek, 2016). Proto byla v rámci diplomové práce pro detekci střevních parazitů vybrána právě real-time PCR.

V publikaci Jackson et al. (2013) byla navržena detekce *S. muris* pomocí klasické PCR a SYBR<sup>®</sup>Green real-time PCR. V práci Jackson et al. (2013) se zaměřili na gen 16S-like rRNA a navrhli 3 páry primerů z toho vybrali jeden, který byl specifický a dostatečně citlivý. Tato publikovaná esej pro SYBR<sup>®</sup>Green real-time PCR byla vysoce specifická a citlivá – detekovali 5 kopií DNA/μl. V diplomové práci se podařilo spolehlivě detekovat až 64 kopií DNA/ul – tzn. navržená esej v publikaci je citlivější. Specifita byla ověřena na podobných příbuzných parazitech – např. *Entamoeba muris* a *Chilomastix* spp. Publikace Fain et al. (2008) se zaměřila na návrh primerů pro detekci *S. muris* pomocí klasické PCR. Navrhnuté primery se zaměřují na oblast karboxylního konce genu pro elongační faktor 1a. Navrhnuté primery byly specifické a citlivé podobně jako primery použité v diplomové práci pro detekci *S. muris*. V obou výše zmíněných publikacích se použily jako biologický materiál exkrementy.

Pro *T. muris* byl proveden návrh primerů pro nested PCR v publikaci Zhang et al. (2023). Primery byly též navrženy pro geny kódující malou podjednotku ribozomu. Primery použité v publikaci Zhang et al. (2023) mají stejně vysokou senzitivitu, spolehlivost a specifitu. Účinnost reakce je 100 %. Ve výzkumu

---

v rámci diplomové práce bylo dosaženo účinnosti reakce 101 %. Specificita v práci Zhang et al. (2023) byla testována na 7 příbuzných parazitech. V diplomové práci jich bylo použito 9. V práci Zhang et al. (2023) bylo možné detekovat 0,1 ng/μl genomové DNA myších výkalů infikovaných *T. muris*. Pro metodu TaqMan real-time PCR bylo možné detekovat *T. muris* při koncentraci  $9,4 \times 10^{-8}$  ng/μl – tzn. metoda TaqMan real-time PCR je daleko více citlivá.

Pro příbuzné parazity řádu *Trichomonadida* bylo navrženo a optimalizováno více esejí pro metodu TaqMan real-time PCR. Například v publikaci Schirm et al. (2007) byly navrženy primery a sonda pro *Trichomonas vaginalis* zaměřené na gen kódující beta tubulin. Pro *T. foetus* existují i komerčně vyráběné kity pro real-time PCR (Guerra et al., 2013). Pro detekci *T. muris* pomocí real-time PCR není žádná dostupná publikace.

Dříve navržené reakce pro *G. muris* nebyly navrženy tak, aby potvrdily rozdíly na úrovni druhů (kvůli nedostatku genetické variability mezi druhy). Real-time PCR je nejslibnější metodou detekce *Giardia* spp. (Whary et al., 2015; Jothikumar et al., 2021). Studie Van Keulena et al. (2002) byla provedena pro srovnání rDNA *G. muris*, *G. ardeae* a *G. duodenalis*, kde byly zjištěny značné rozdíly. Další metodou tedy je genotypizovat druhy *Giardia* a skupiny *G. duodenalis* s použitím oblasti zahrnující gen 5.8S a 2 boční vnitřní transkribované spacery ribozomálního genu. Porovnání sekvencí a fylogenetická analýza ukázala, že *G. ardeae*, *G. muris*, *G. microti* i *G. duodenalis* lze snadno rozlišit (Cacció et al., 2010). Proto byly navržené primery zaměřeny na geny kódující malou podjednotku ribozomu. U *G. muris* byly navrženy primery na oblast genů kódující 16S, 23S a 5.8S rRNA, který je variabilní mezi druhy (Stehlíková, nepublikováno). Na geny kódující malou podjednotku ribozomu u *G. muris* se také zaměřila práce Klotz et al. (2021).

V publikaci Klotz et al. (2021) byla pro izolaci DNA použita stejná metoda – tj. kolonková metoda izolace pomocí komerčně dostupného kitu. Pro reakci TaqMan real-time PCR byla použita reakční směs o objemu 25 μl. Reakční směs obsahovala 12,5 μl Master Mix, 1 μl primerů, 0,5 μl sondy a 1-5 μl DNA templátu a zbytek objemu tvořila voda. Reakce začínala hold stage při 95 °C po dobu 10 minut, následovala denaturace při 95 °C po dobu 15 vteřin a annealing při 60 °C po dobu 30 vteřin. Pro analýzu bylo použito 45 cyklů. V diplomové práci byla pro reakci TaqMan real-time PCR použita reakční směs o objemu 10 μl. Reakční

---

směs obsahovala 7  $\mu\text{l}$  Master Mix, 1,2  $\mu\text{l}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,3  $\mu\text{l}$  primerů, 0,2  $\mu\text{l}$  sondy a 1  $\mu\text{l}$  DNA templátu. Reakce začínala hold stage při 95  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minut, následovala denaturace při 95  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 vteřin a annealing při 57  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 1 minuty. Pro analýzu bylo použito 45 cyklů. Nižší objem reakční směsi v diplomové práci byl zvolen z důvodu úspory reagensů a tím i financí. Také byl použit menší objem DNA templátu, než je tomu v publikaci Klotz et al. (2021). Specificita v publikaci Klotz et al. (2021) byla otestována na 8 příbuzných druzích. V diplomové práci jich bylo použito 9 z toho byl 1 společný s publikací Klotz et al. (2021). Limit detekce byl v práci Klotz et al. (2021) stanoven na hodnotu Ct 36. V diplomové práci byl stanoven na Ct 32.

---

## Závěr

V diplomové práci na téma „Molekulární detekce střevních parazitů u laboratorních hlodavců“ byla provedena optimalizace metody TaqMan real-time PCR pro detekci střevních parazitů *Spironucleus muris*, *Tritrichomonas muris* a *Giardia muris*. Optimalizace pro každou esej proběhla úspěšně. Pro optimalizaci esejí byly získány standardy pomocí metody klonování, z kterých byla vypracována ředící řada a dále standardní křivka. Ze standardní křivky byla stanovena účinnost a spolehlivost reakce. Navržené primery a sondy jsou vysoce specifické a citlivé. Pro každou esej byl také stanoven limit detekce. Takto optimalizované eseje pro metodu TaqMan real-time PCR jsou vhodné pro detekci střevních parazitů *S. muris*, *T. muris* a *G. muris*. Tyto parazity je možné detekovat s vysokou spolehlivostí za stanovených podmínek a s použitím daných primerů a sond. Dále byla porovnána vhodnost různých druhů biologického materiálu pro detekci parazitů *S. muris*, *T. muris* a *G. muris* pomocí metody TaqMan real-time PCR. Pro detekci parazita *S. muris* je považován za nejvhodnější biologický materiál exkrement. Pro detekci parazitů *T. muris* a *G. muris* je nejvhodnější biologický materiál bukalní stěr.

---

## Seznam použité literatury

1. Abd el Ghaffar, F. M., Azab, M. E., Salem, S. A., Habib, K. S., Maklad, K. M., Habib, F.S. (1994). Evaluation of two cultural media (CPLM & TYM) for isolation and maintenance of *Trichomonas vaginalis* stocks in the laboratory. *J Egypt Soc Parasitol.* 24(3), 611-619.
2. Abd-Elsalam, K. A., 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology.* 2(5), 91–5, doi: 10.5897/AJB2003.000-1019.
3. Ackerknecht, E. H. (2016). *A Short History of Medicine.* Čtvrté vydání. Johns Hopkins University Press, Baltimore. ISBN 978-1-4214-1955-8.
4. Adamberg, K., Valgepea, K., Vilu R. (2015). Advanced continuous cultivation methods for systems microbiology. *Microbiology Society.* 161(9), 1707-1719. doi: 10.1099/mic.0.000146.
5. Al-Aboody, B. A., Al-Mosawi, R. A., Hafedh, A. A. (2016). Detection of intestinal parasites in laboratory animals (rats and mice). *European Journal of Biomedical.* 3(6), 7-9. doi: 10.5455/jva.
6. Ares, M. (2012). Bacterial RNA isolation. *Cold Spring Harbor protocols.* 2012(9), 1024-1027. doi: 10.1101/pdb.prot071068.
7. Baker, D. G. (2006). Parasitic Diseases. In: Suckow, M. A., Weisbroth, S. H., Franklin, C. L. (Eds.). *The Laboratory Rat (Second Edition).* Druhé vydání. Academic Press, London, pp. 453-478. ISBN 978-0-12-074903-4.
8. Baker, D. G. (2007). *Flynn's Parasites of Laboratory Animals.* Druhé vydání. John Wiley & Sons. ISBN 978-0-8138-1202-1.
9. Beránek, M. (2016). *Molekulární genetika pro bioanalytiku.* První vydání. Karolinum, Praha. ISBN 978-80-246-3224-7.
10. Brown, C., Donnelly, T. M. (2012). Chapter 27 - Disease Problems of Small Rodents. In: Quesenberry, K. E., Carpenter, J. W. (Eds.). *Ferrets, Rabbits, and Rodents.* Třetí vydání. W.B. Saunders, pp. 354-372. ISBN 978-1-4160-6621-7.
11. Brown, T. A. (2020). *Gene cloning and DNA analysis: an introduction.* Osmé vydání. Wiley-Blackwell, New Jersey. ISBN 978-1-1196-4078-3.
12. Burr, H. N., Paluch, L. R., Roble, G. S., Lipman, N. S. (2012). Parasitic Diseases. In: Suckow, M. A., Stevens, K. A., Wilson, R. P. (Eds.). *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents.* První vydání. Academic Press, London, pp. 839-866. ISBN 978-0-12-380920-9.
13. Bustin, S. A. (2005). Real-time PCR. *Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics.* 10(1), 117–121. doi: 10.1081/E-EDGP 120020684.

- 
14. Cacció, S., Beck, R., Almeida, A., Bajer, A., Pozio, E. (2010). Identification of Giardia Species and Giardia Duodenalis Assemblages by Sequence Analysis of the 5.8S rDNA Gene and Internal Transcribed Spacers. *Parasitology*, 137(6), 919-925. doi:10.1017/S003118200999179X.
  15. Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R. et al. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen Trichomonas vaginalis. *Science*. 315(5809), 207–12. doi: 10.1126/science.1132894.
  16. Castelli, G., Oliveri, E., Valenza, V., Giardina, S., Facciponte, F., La Russa, F., Vitale, F., Bruno, F. (2023). Cultivation of Protozoa Parasites In Vitro: Growth Potential in Conventional Culture Media versus RPMI-PY Medium. *Vet. Sci.* 10(4), 252. doi: 10.3390/vetsci10040252.
  17. Castiglioni, A. (2018). *A History of Medicine*. První vydání. Routledge, London. ISBN 978-0-4290-1988-3.
  18. Clark, C. G., Diamond, L. S. (2002). Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clin Microbiol Rev.* 15(3), 329-341. doi: 10.1128/cmr.15.3.329-341.2002.
  19. Clark, D. P., Pazdernik, N. J., McGehee, M. R. (2019). Polymerase Chain Reaction. *Molecular Biology*. 168-198. doi: 10.1016/B978-0-12-813288-3.00006-9.
  20. Da Costa, A. S., Graham, T. M., Duncan, J. A., Pillai, S. P. S., Lund, J. M. (2019). Detection and treatment strategy for Trichomonas muris in the common laboratory mouse. [online] Biorxiv [6.2.2024]. Dostupné z: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/827055v1.full.pdf>
  21. Dreesen, L., De Bosscher, K., Grit, G., Staels, B., Lubberts, E., Bauge, E., Geldhof, P. (2014). Giardia Muris Infection in Mice Is Associated with a Protective Interleukin 17A Response and Induction of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. *Infect Immun.* 82(8), 3333-40. doi: 10.1128/IAI.01536-14.
  22. Elliott, W. H., Elliott, D. C. (2009). *Biochemistry and Molecular Biology*. Čtvrté vydání. OUP Oxford. ISBN 978-0-1992-2671-9.
  23. Escalante, N. K., Lemire, P., Cruz Tleugabulova, M., Prescott, D., Mortha, A., Streutker, C. J., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Mallevey, T. (2016). The common mouse protozoa Trichomonas muris alters mucosal T cell homeostasis and colitis susceptibility. *J Exp Med.* 213(13), 2841-2850. doi: 10.1084/jem.20161776.
  24. Fain, M., Karjala, Z., Perdue, K., Copeland, M., Cheng, L., Elkins, W. (2008). Detection of Spironucleus muris in Unpreserved Mouse Tissue and Fecal Samples by Using a PCR Assay. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* 47(5), 39-43.



- 
25. Fattahi, S., Amirbozorgi, G., Lotfi, M., Amini Navaei, B., Kavosian, S., Asouri, M., Akhavan-Niaki, H. (2017). Development of a universal taqman probe for mRNA gene expression analysis. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*. 42(3), 363–370. doi: 10.1007/s40995-017-0173-5.
  26. Feix, A. S., Cruz-Bustos, T., Ruttkowski, B., Joachim, A. (2023). In vitro cultivation methods for coccidian parasite research. *International Journal for Parasitology*. 53(9), 477-489. doi: 10.1016/j.ijpara.2022.10.002.
  27. Figueroa-Bossi, N., Balbontín, R., Bossi, L. (2022). Preparing Plasmid DNA from Bacteria. *Cold Spring Harbor protocols*. 2022(10). doi: 10.1101/pdb.prot107852.
  28. Fox, J. G., Anderson, L. C., Loew, F. M., Quimby F. W. (2002). *Laboratory Animal Medicine*. Druhé vydání. Academic Press, London. ISBN 978-0-12-263951-7.
  29. Gangisetty, O., Reddy, D.S. (2009). The optimization of TaqMan real-time RT-PCR assay for transcriptional profiling of GABA-A receptor subunit plasticity. *J Neurosci Methods*. 181(1),58-66. doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.04.016.
  30. Garibyan, L., Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 133(3), 1–4. doi: 10.1038/jid.2013.1.
  31. Gill, C., van de Wijgert, J. H., Blow, F., Darby, A. C. (2016). Evaluation of Lysis Methods for the Extraction of Bacterial DNA for Analysis of the Vaginal Microbiota. *Public Library of Science One*. 11(9), 1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0163148.
  32. Greaves, P. (2012). *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies*. Čtvrté vydání. Academic Press, London. ISBN 978-0-444-53856-7.
  33. Green M. R., Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2019(2). doi: 10.1101/pdb.prot095182.
  34. Guerra, A. G., Hill, J. E., Waldner, C. L., Campbell, J., Hendrick, S. (2013). Sensitivity of a real-time polymerase chain reaction for *Tritrichomonas fetus* in direct individual and pooled preputial samples. *Theriogenology*. 80(9), 1097-1103. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.011.
  35. Harrington, B. J. (2008). Microscopy of 4 Pathogenic Enteric Protozoan Parasites: A Review. *Laboratory Medicine*. 39(4), 231-238. doi: 10.1309/83G3PE2H1V2NY9FK.

- 
36. Isayama, K., Watanabe, K., Okamoto, M., Murata, T., Mizukami, Y. (2020). Standardization of an LNA-based TaqMan assay qPCR analysis for *Aspiculuris tetraptera* DNA in mouse faeces. *BMC microbiology*. 20(1), 1-12. doi: 10.1186/s12866-020-02053-6.
37. Jackson, G. A., Livingston, R. S., Riley, L. K., Livingston, B. A., Franklin, C. L. (2013). Development of a PCR assay for the detection of *Spironucleus muris*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 52(2), 165-170.
38. Jia, Y. (2012). Real-time PCR. *Methods in cell biology*. 112, 55–68. doi: 10.1016/B978-0-12-405914-6.00003-2.
39. Jothikumar, N., Murphy, J. L., Hill, V. R. (2021). Detection and Identification of *Giardia* Species Using Real-time PCR and Sequencing. *Journal of Microbiological Methods*. 189(9). doi: 10.1016/j.mimet.2021.106279.
40. Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology – New Interdisciplinary Science*. 147–163. doi: 10.5772/intechopen.86491.
41. Kashiwagi, A., Kurosaki, H., Luo, H., Yamamoto, H., Oshimura, M., Shibahara, T. (2009). Effects of *Tritrichomonas muris* on the Mouse Intestine: A Proteomic Analysis. *Experimental animals*. 58(5), 537-42. doi: 10.1538/expanim.58.537.
42. Klotz, C., Radam, E., Rausch, S., Gosten-Heinrich, P., Aebischer, T. (2021). Real-Time PCR for molecular detection of zoonotic and non-zoonotic *Giardia* spp. in wild rodents. *Microorganisms*. 9(8), 1610. doi: 10.3390/microorganisms9081610.
43. Larionov, A., Krause, A., Miller, W. (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*. 6(62), 1-16. doi: 10.1186/1471-2105-6-62.
44. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, CH. Y., Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal Of Visualized Experiments*. 20(62), 231–250. doi: 10.3791/3923.
45. Martínez, C. I., Iriarte, L. S., Salas, N., Alonso, A.M., Pruzzo, C. I., Dos Santos Melo, T., Pereira-Neves, A., de Miguel, N., Coceres, V. M. (2023). Prolonged survival of venereal *Tritrichomonas foetus* parasite in the gastrointestinal tract, bovine fecal extract, and water. *Microbiol Spectr*. 11(6), 429-450. doi: 10.1128/spectrum.00429-23.
-

- 
46. Mata-Cárdenas, B. D., Hernández-García, M. E., González-Salazar, F., Garza-González, J. N., Palacios-Corona, R., Cortés-Gutiérrez, E. I., Vargas-Villarreal J. (2012). Axenic cultivation and comparative phospholipase A2 activity of *Giardia duodenalis* in a serum-free medium. *Acta Parasitol.* 57(3), 211-215. doi: 10.2478/s11686-012-0035-4.
47. McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Couturier, M. R., Humphries R. M. (2014). Detection of Intestinal Protozoa in the Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol.* 52(3), 712-720. doi: 10.1128/jcm.02877-13.
48. Meurs, L., Polderman, A.M., Vinkeles Melchers, N. V., Brienen, E. A., Verweij, J. J., Groosjohan, B., Mendes, F., Mechendura, M., Hepp, D. H., Langenberg, M. C., Edelenbosch, R., Polman, K., van Lieshout, L. (2017). Diagnosing Polyparasitism in a High-Prevalence Setting in Beira, Mozambique: Detection of Intestinal Parasites in Fecal Samples by Microscopy and Real-Time PCR. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(1), 1-18. doi: 10.1371/journal.pntd.0005310.
49. Momčilović, S., Cantacessi, C., Arsić-Arsenijević, V., Otranto, D., Tasić-Otašević, S. (2019). Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. *Clinical Microbiology and Infection.* 25(3), 290-309. doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.028.
50. Monroy-Contreras, R., Vaca, L. (2011). Molecular beacons: powerful tools for imaging RNA in living cells. *J Nucleic Acids.* 2011:741723. doi: 10.4061/2011/741723.
51. Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta.* 439, 231–50. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017.
52. Pandya, A., Bhosale, R. S., Singh, V. (2022). *Design, Principle and Application of Self-Assembled Nanobiomaterials in Biology and Medicine.* První vydání. Academic Press, London. ISBN 978-0-323-90984-6.
53. Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal.* 4(1), 30 – 6. doi: 10.3329/akmmcj.v4i1.13682.

- 
54. Russell, D. W., Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Čtvrté vydání. Cold Spring Harbor, New York. ISBN 978-1-936113-42-2.
55. Rutledge, R. G., Cote, C. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic acids research*. 31(16), 93. doi: 10.1093/nar/gng093.
56. Ryan, U., Zahedi, A. (2019). Chapter Six - Molecular Epidemiology of Giardiasis from a Veterinary Perspective. *Advances in Parasitology*. 106, 209-254. doi: 10.1016/bs.apar.2019.07.002.
57. Říhová, M. a kol. (2005). *Kapitoly z dějin lékařství*. První vydání. Karolinum, Praha. ISBN: 80-246-1021-3.
58. Schirm, J., Bos, P. A. J., Roozeboom-Roelfsema, I. K., Luijt, D. S., Möller, L. V. (2007). Trichomonas vaginalis detection using real-time TaqMan PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 68(2), 243-247. doi: 10.1016/j.mimet.2006.08.002.
59. Sobotyck, C., Upton, K. E., Lejeune, M., Nolan, T. J., Marsh, A. E., Herrin, B. H., Borst, M. M., Piccione, J., Zajac, A. M., Camp, L. E., Pulaski, C. N., Starkey, L. A., von Simson, C., Verocai, G. G. (2021). Retrospective study of canine endoparasites diagnosed by fecal flotation methods analyzed across veterinary parasitology diagnostic laboratories, United States, 2018. *Parasit Vectors*. 14(1), 439. doi: 10.1186/s13071-021-04960-7.
60. Stensvold, C. R., Nielsen, H. V. (2012). Comparison of Microscopy and PCR for Detection of Intestinal Parasites in Danish Patients Supports an Incentive for Molecular Screening Platforms. *J Clin Microbiol*. 50(2), 540-541. doi: 10.1128/jcm.06012-11.
61. Sutrave, S., Richter, M. H. (2021). The Truman Show for protozoan parasites: A review of in vitro cultivation platforms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 15(8), 1-21. doi: 10.1371/journal.pntd.0009668.
62. Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. (2005). *Metody molekulární biologie*. První vydání. Masarykova Univerzita, Brno. ISBN 978-80-210-3841-7.
63. Švejdová, K. (2011). *Historie ošetrovatelství a medicíny*. První vydání. Technická Univerzita v Liberci, Ústav zdravotnických studií. ISBN 978-80-7372-645-4.

- 
64. Tagliaferro, S. S., Zejnelagic, A., Farrugia, R., Wettinger, S. B. (2021). Comparison of DNA extraction methods for samples from old blood collections. *Biotechniques*. 70(5), 243-250. doi: 10.2144/btn-2020-0113.
65. Tan, S. C., Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of biomedicine and biotechnology*. 2009(574398), 1-10. doi: 10.1155/2009/574398.
66. Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J., Brown, T. (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res*. 28(19), 3752-3761. doi: 10.1093/nar/28.19.3752.
67. Tyagi, S., Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*. 14(3),303-308. doi: 10.1038/nbt0396-303.
68. Valasek, M. A., Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*. 29(3), 151–9. doi: 10.1152/advan.00019.2005.
69. Van Keulen, H., Campbell, S. R., Erlandsen, S. L., Jerroll, E. L. (2002). Cloning and Restriction Enzyme Mapping of Ribosomal DNA of *Giardia Duodenalis*, *Giardia Ardeae* and *Giardia Muris*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 46(2), 275-284. doi: 10.1016/0166-6851(91)90051-7.
70. Van Lieshout, L., Roestenberg, M. (2015). Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. *Clinical Microbiology and Infection*. 21(6), 520-528. doi: 10.1016/j.cmi.2015.03.015.
71. Verweij, J. J. (2014). Application of PCR-based methods for diagnosis of intestinal parasitic infections in the clinical laboratory. *Parasitology*. 141(14), 1863-1872. doi: 10.1017/S0031182014000419.
72. Voros, G. B., Blair, R. V., Andrews, D. D., Dobek, G.L. (2021). Evaluation of Therapeutic Approaches for the Treatment of *Spiroplasma muris* in Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 60(2), 146-151. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-20-000067.
73. Whary, M. T., Baumgarth, N., Fox, J. G., Barthold, S. W. (2015). Biology and Diseases of Mice. In: Fox, J. G., Anderson, L. C., Otto, G. M., Pritchett-Corning, K. R., Whary, M. T. (Eds.). *Laboratory Animal Medicine*. Třetí vydání. Academic Press, London, pp. 43-149. ISBN 978-0-12-409527-4.
74. Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S., Brown, T., Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol*. 17, 804–807. doi: 10.1038/11751.
-

- 
75. Wilson, M., Schantz, P.M. and Nutman, T. (2006). Molecular and Immunological Approaches to the Diagnosis of Parasitic Infections. In: Detrick, B., Hamilton, R. G., Folds, J. D. (Eds.). *Manual of Molecular and Clinical Lab Immunology*. Sedmé vydání. ASM Press, Washington, D.C., 557-568. ISBN 978-1-6836-7413-9.
76. Xu, F., Jiménez-González, A., Einarsson, E., Ástvaldsson, Á., Peirasmaki, D., Eckmann, L., Andersson, J. O., Svärd, S. G., Jerlström-Hultqvist, J. (2020). The Compact Genome of *Giardia Muris* Reveals Important Steps in the Evolution of Intestinal Protozoan Parasites. *Microb Genom.* 6(8). doi: 10.1099/mgen.0.000402.
77. Xu, F., Jiménez-González, A., Kurt, Z., Ástvaldsson, Á., Andersson, J. O., Svärd, S. G. (2022). A chromosome-scale reference genome for *Spironucleus salmonicida*. *Scientific Data.* 585(9), 1–7. doi: oi.org/10.1038/s41597-022-01703-w.
78. Zarei, Z., Mohebbali, M., Khanaliha, K., Kia, E. B., Motevalli Haghi, A., Heidari, Z., Rezaeian, T., Rezaeian, M. (2018). Detection of Pseudocyst Forms of *Trichomonas muris* in Rodents from Iran. *Iran J Public Health.* 47(5), 729-734.
79. Zhang, H., Zhang, N., Li, J., Zhao, P., Li, X., Wang, X., Zhang, X., Yuan, B., Gao, F., Gong, P., et al. (2023). Development of Nested Polymerase Chain Reaction with Novel Specific Primers for Detection of *Tritrichomonas muris* Infection in Laboratory Mice. *Animals.* 13 (20), 3177. doi: 10.3390/ani13203177.
80. Zoetendal, E., Heilig, H., Klaassens, E., Booiijink, C. C. G. M., Kleerebezem, M., Smidt, H., de Vos, W. M. (2006). Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. *Nat Protoc.* 2006(1), 870–873. doi: 10.1038/nprot.2006.142.

---

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Přístroj pro real-time PCR .....	28
Obrázek 2: Schématická ilustrace TaqMan real-time PCR (Gangisetty a Reddy, 2009) .....	30
Obrázek 3: Grafické znázornění výsledku real-time PCR (Larionov et al., 2005) ....	31
Obrázek 4: Vizualizace PCR produktů pomocí gel. elektroforézy – <i>S. muris</i> , <i>T. muris</i> , <i>G. muris</i> .....	46
Obrázek 5: Vizualizace PCR produktů pomocí gelové elektroforézy – primery M13 .....	47
Obrázek 6: Vizualizace PCR produktů pomocí gelové elektroforézy – specifické primery .....	47
Obrázek 7: Amplifikační křivky ředící řady klonu <i>S. muris</i> .....	48
Obrázek 8: Standardní křivka ředící řady klonu <i>S. muris</i> .....	50
Obrázek 9: Amplifikační křivky ředící řady klonu <i>T. muris</i> .....	51
Obrázek 10: Standardní křivka ředící řady klonu <i>T. muris</i> .....	52
Obrázek 11: Amplifikační křivky ředící řady klonu <i>G. muris</i> .....	54
Obrázek 12: Standardní křivka ředící řady klonu <i>G. muris</i> .....	55

---

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Sekvence primerů a TaqMan sond (Stehlíková, nepublikováno) .....	38
Tabulka 2: Složení reakční směsi pro real-time PCR .....	38
Tabulka 3: Reakční cyklus pro TaqMan real-time PCR .....	39
Tabulka 4: Izoláty plazmidové DNA použité pro testování specifity .....	40
Tabulka 5: Složení reakce – Hot start PCR.....	41
Tabulka 6: Reakční cyklus – Hot start PCR.....	41
Tabulka 7: Reakční cyklus – Hot start PCR pro primery M13 .....	44
Tabulka 8: Koncentrace DNA klonů.....	48
Tabulka 9: Ředící řada klonu <i>S. muris</i> – sestavení standardní křivky .....	49
Tabulka 10: Ředící řada klonu <i>T. muris</i> – sestavení standardní křivky .....	52
Tabulka 11: Ředící řada klonu <i>G. muris</i> – sestavení standardní křivky .....	55
Tabulka 12: Verifikace pro <i>S. muris</i> , <i>T. muris</i> a <i>G. muris</i> .....	57



---

## Seznam použitých zkratek

Ag – antigen

AMP – ampicillin

CTAB – cetyl trimethylammonium bromid

DNA – deoxyribonukleová kyselina; z aj. deoxyribonucleic acid

dNTPs – deoxyribonukleotidtrifosfáty

EIA – enzymová imunoanalýza; z aj. enzyme immunoassay

*G. muris* – *Giardia muris*

GMO – geneticky modifikovaný organizmus

PAS – Periodic Acid-Schiff barvení

PCR – polymerázová řetězová reakce; z aj. polymerase chain reaction

POCT – dostupnost a přístupnost testů v místě péče; z aj. point of care testing

qPCR – kvantitativní PCR; z aj. quantitative PCR

RNA – ribonukleová kyselina; z aj. ribonucleic acid

*S. muris* – *Spiroplasma muris*

SDS – dodecylsírán sodný

SPF – specified-pathogen free

SS – malá podjednotka ribozomu; z aj. small subunit

*T. muris* – *Tritrichomonas muris*

TAE – Tris-acetátový pufr

*Taq* polymeráza – termostabilní DNA polymeráza odvozena od bakterie *Thermus aquaticus*

TBE – Tris-borátový pufr

T<sub>m</sub> – teplota tání; z aj. melting temperature