



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Optimalizace real-time PCR pro detekci bakterie
Klebsiella pneumoniae

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Autor: Šárka Elstnerová

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

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Optimalizace real-time PCR pro detekci bakterie *Klebsiella pneumoniae*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 6.4.2023

Podpis

Poděkování

Mé poděkování patří Ing. Dagmar Stehlíkové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat. Děkuji také mé rodině, která mi byla podporou po celou dobu studia a bez které bych tuto práci nemohla dokončit.

Optimalizace real-time PCR pro detekci bakterie

Klebsiella pneumoniae

Abstrakt

Předmětem této bakalářské práce je optimalizace real-time PCR pro detekci bakterie *Klebsiella pneumoniae* s využitím primerů z publikace Sun et al, 2010, pro SYBR Green real-time PCR a end point PCR a primerů navržených vedoucí této práce (Stehlíková, nepublikováno) pro TaqMan real-time PCR. Vybrané primery byly následně testovány na vzorcích čisté kultury *Klebsiella pneumoniae* 4799 ze sbírky DSMZ a verifikovány na 41 vzorcích stěrů z bukalní sliznice. Dále bylo provedeno stanovení specificity za použití 26 izolátů bakteriální DNA a senzitivity detekčních metod PCR v závislosti na jejich rutinním používání, stanovení jejich detekčních limitů a porovnání. Optimalizovaná metoda je senzitivní a specifická pro danou bakterii, vhodná pro využití k detekci bakterie *Klebsiella pneumoniae*.

Klíčová slova

Molekulární detekce; SYBR Green; TaqMan

Optimization of Real-Time PCR for detection of *Klebsiella pneumoniae*

Abstract

The subject of this bachelor's thesis is the optimization of real-time PCR for the detection of the bacteria *Klebsiella pneumoniae* using primers from the publication Sun et al, 2010, for SYBR Green real-time PCR and end point PCR and primers designed by the supervisor of this thesis (Stehlíková, unpublished) for TaqMan real-time PCR. The selected primers were subsequently tested on pure culture samples of *Klebsiella pneumoniae* 4799 from the DSMZ collection and verified on 41 buccal swabs. Furthermore, assessment of specificity was accomplished using 26 bacterial DNA isolates. Assessment of sensitivity of PCR detection methods was accomplished depending on their routine use, assessment of their limits of detection and comparison. The optimized method is sensitive and specific for the bacteria, suitable for use in the detection of bacteria *Klebsiella pneumoniae*.

Key words

Molecular detection; SYBR Green; TaqMan

Obsah

1	Úvod	8
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
2.1	Klasifikace.....	9
2.2	Taxonomie.....	9
2.3	Morfologie.....	9
2.4	Virulence	9
2.5	Patogenita.....	10
2.6	Výskyt.....	10
2.7	Onemocnění	10
2.8	Epidemiologie	11
2.9	Klinické projevy.....	11
2.10	Léčba.....	11
2.11	Způsoby detekce.....	12
2.11.1	Mikroskopie	12
2.11.2	Kultivace	12
2.11.3	Serologie	13
2.11.4	MLST.....	13
2.11.5	PCR a její modifikace	13
3	Metody.....	14
3.1	Izolace DNA.....	14
3.1.1	Lyze buněk	14
3.1.2	Neutralizace nežádoucích látek	14
3.1.3	Metody izolace	15
3.2	PCR.....	16
3.3	Elektroforéza	17
3.4	Real-time PCR	18
4	Cíl práce.....	21
5	Materiál a metody.....	22
5.1	Bakteriální kmeny	22
5.2	Izolace DNA.....	23
5.3	SYBR Green real-time PCR.....	23
5.4	TaqMan Real-time PCR.....	25

5.5	End point PCR.....	27
5.6	Elektroforéza	28
6	Výsledky.....	29
6.1	SYBR Green real-time PCR.....	29
6.2	TaqMan real-time PCR	32
6.3	End point PCR.....	34
6.4	Porovnání metod	35
7	Diskuze	36
8	Závěr.....	39
	Seznam literatury	40
	Seznam obrázků.....	46
	Seznam tabulek	47
	Seznam grafů	48
	Seznam zkratk	49

1 Úvod

Klebsiella pneumoniae je z hlediska klinického významu nejvýznamnějším bakteriálním druhem rodu *Klebsiella*. Jedná se o oportunní bakterii, která je příčinou nozokomiálních infekcí. Při absenci léčby je zaznamenána vysoká míra úmrtnosti, a to včetně absence léčby infekcí močových cest a kontaminace ran (Jasim, nedatováno).

Pro zahájení léčby je nutná včasná detekce této bakterie a její spolehlivé odlišení od příbuzných druhů, jako např. *Klebsiella oxytoca*, která je druhým nejrozšířenějším druhem bakterií rodu *Klebsiella*, hned po *K. pneumoniae* (Kovtunovych et al., 2003).

Metodu real-time PCR lze využít pro detekci mnoha patogenů, a to včetně bakterie *K. pneumoniae*. Tato metoda je po optimalizaci specifická a senzitivní. Vzhledem k náročnosti získání a zpracování vzorků je vhodné mít citlivou metodu, při které lze použít neinvazivní odběr vzorku a detekovat patogen po extrakci celkové DNA.

Vhodným in silico zpracováním dat je možné navrhnout reakční komponenty tak, aby byly vhodné pro optimalizaci reakční směsi. Metoda detekce je za určitých podmínek přenositelná.

Předmětem této bakalářské práce je optimalizace metody real-time PCR nalezením primerů popř. sond specifických pro detekci bakterie *K. pneumoniae*, jejich následné testování na vzorcích čisté kultury *K. pneumoniae* a verifikace na vzorcích stěrů z bukální sliznice. Dále bylo provedeno stanovení specifity a sensitivity detekčních metod PCR v závislosti na jejich rutinním používání, stanovení jejich detekčních limitů a porovnání.

Optimalizovanou metodu real-time PCR bude možno využít při detekci bakterie *K. pneumoniae*. Detekce bude specifická pro danou bakterii.

2 *Klebsiella pneumoniae*

2.1 Klasifikace

K. pneumoniae byla poprvé izolována německým lékařem Edwinem Klebsem ve druhé polovině devatenáctého století (Prince, et al., 1997). Bakterii *K. pneumoniae* objevil a popsal v roce 1882 Carl Friedlander z pitvy plic pacienta zemřelého na zápal plic. Získala tak svůj původní název Friedlanderův bacil a teprve o 4 roky později byla přejmenována na *Klebsiella pneumoniae* (Jamshaid et al., 2005).

K. oxytoca je druhým nejčastěji se vyskytujícím druhem rodu *Klebsiella*, hned za *K. pneumoniae*. Mezi další druhy patří *Klebsiella planticola*, *Klebsiella ornithinolytica* a *Klebsiella terrigena*, které se vyskytují pouze zřídka (Kovtunovych et al., 2003).

2.2 Taxonomie

K. pneumoniae je mikroorganismus rodu *Klebsiella*, patří do klinicky významné čeledi *Enterobacteriaceae*, řádu *Enterobacteriales*, třídy *Gammaproteobacteria*, která spadá do kmene *Proteobacteria* domény *Bacteria* (CABI digital library, 2021).

2.3 Morfologie

K. pneumoniae je krátká, objemná, rovná, tyčinkovitá, gramnegativní bakterie o velikosti 1 – 2 μm x 0,5 – 0,8 μm . Uspořádané jsou jednotlivě nebo ve dvojicích či krátkých řetězcích, někdy ve shlucích. Jedná se o nepohyblivou bakterii bez bičíku a spor (Batra, 2018).

2.4 Virulence

Bezprostředně po vstupu do těla, může bakterie vykazovat vysoký stupeň virulence a rezistence vůči antibiotikům (Jondle et al., 2018).

K. pneumoniae je obklopena polysacharidovou kapslí, jedná se o nejvýznamnější charakteristický faktor virulence, který chrání bakterie před fagocytózou makrofágy (Lawlor et al., 2005).

Druhým faktorem jsou lipopolysacharidy pokrývající vnější membránu gramnegativních bakterií. Imunitní odpověď pacienta na lipopolysacharid vede ke spuštění kaskády zánětlivých reakcí v hostitelském organismu, následně sepsi a septickému šoku (Martin a Bachman, 2018).

Dalšími faktory virulence jsou adhezivní fimbrie umožňující bakterii připojit se k hostitelským buňkám (Lawlor et al., 2005) a také siderofory se schopností získávat

od hostitele železo, které je nezbytným kofaktorem pro metabolismus bakterií (Clegg a Murphy, 2016).

2.5 Patogenita

U lidí se *K. pneumoniae* vyskytuje v gastrointestinálním traktu a nosohltanu, přes který může vstoupit do krevního oběhu či jiných tkání a způsobit tak infekci (Wang et al., 2020). *K. pneumoniae* je jedním z nejvýznamnějších nemocničních patogenů. Infekce se snadno šíří přímým kontaktem z pacienta na pacienta často prostřednictvím kontaminovaných rukou nemocničního personálu (Starzyk-Łuszcz et al., 2017). Zdrojem infekce je dále důsledkem chybných hygienických postupů kontaminované lékařské vybavení (katétry, ventilátory, chirurgické nástroje). Vzhledem ke své schopnosti rychlého šíření mají tyto bakterie tendenci způsobovat ohniska nozokomiálních infekcí v nemocničním prostředí. Vzhledem k antibiotické rezistenci omezující možnosti terapie jsou nutná přísnější opatření pro zamezení šíření nákazy (Podschun a Ullmann, 1998).

2.6 Výskyt

K. pneumoniae se vyskytuje napříč celou přírodou ve vodě, půdě, rostlinách, zvěři i lidech. Běžně u lidí kolonizuje povrchy sliznic a v malém množství je součástí běžné střevní mikroflóry člověka (Martin a Bachman, 2018).

2.7 Onemocnění

Bakterie rodu *Klebsiella* jsou řazeny mezi oportunní patogeny kolonizující povrchy sliznic, aniž by působily nějaké patologie, nicméně se mohou ze sliznic šířit dále do jiných tkání, kde mohou způsobovat život ohrožující infekce jako zápal plic, infekce močových cest, infekce krevního řečiště a sepse (Bengoecha et al., 2019).

K. pneumoniae byla identifikována jako hlavní nosokomiální patogen (Fukigai et al., 2007) se schopností způsobovat pneumonii, bronchitidu, infekce močových cest a infekce ran, zejména u kojenců, diabetiků, onkologických pacientů, pacientů léčených antibiotiky a u pacientů staršího věku (Podschun a Ullmann, 1998).

Pneumonie způsobená *K. pneumoniae* je obvykle spojena s vysokou mortalitou (Chen et al., 2022). Jedná se obvykle o akutní závažné onemocnění doprovázené kašlem, bolestí na hrudi, dušností a horečkou. Součástí je nekrotizující plicní zánět s přítomností hustého rosolovitého krvavého sputa. Zřídka dochází k metastatickým komplikacím způsobujícím perikarditidis, artritidis či meningitidis (Prince et al., 1997).

2.8 Epidemiologie

K. pneumoniae je kmenzální a oportunní bakterie. V posledních desetiletích se stala hlavním původcem nemocničních infekcí. Stále častěji jsou hlášeny případy hypervirulentních a multirezistentních klonů *K. pneumoniae* u nozokomiálních i komunitních infekcí. *K. pneumoniae* způsobuje širokou škálu infekcí zejména u pacientů s oslabeným imunitním systémem. Její přenos je způsoben prostřednictvím povrchu kůže zdravotnických pracovníků a gastrointestinálním traktem pacientů (Moradigaravand et al., 2017).

Rozložení četnosti míry výskytu infekcí *K. pneumoniae* se liší podle země a demografie. Invazivní komunitní infekce jsou hlášeny zejména ve východní a jihovýchodní Asii a u osob asijského etnika (Lam et al., 2021).

V západní kultuře se odhaduje, že přibližně 3–5 % veškeré komunitní pneumonie je způsobena *K. pneumoniae*, ale v rozvojových zemích představuje přibližně 15 % všech případů pneumonie. Celkově *K. pneumoniae* představuje přibližně 12 % všech nemocničních pneumonií. U pacientů s ventilátory, u nichž se rozvine zápal plic, je až 12 % způsobeno *K. pneumoniae*, zatímco u pacientů, kteří nejsou ventilováni, se vyskytuje pouze v 7 %. Úmrtnost se pohybuje od 50 % do 100 % u pacientů trpících alkoholismem a septikémií (Ashurst, 2022).

2.9 Klinické projevy

Symptomy komunitní pneumonie se vyznačují horečkou, rosolovitým sputem, namáhavým dýcháním, kašlem a bolestí na hrudi (Prince et al., 1997). *K. pneumoniae* v krevním oběhu může způsobit meningitidu, která postihuje centrální nervový systém. Symptomy zahrnují ostrou bolest hlavy, nevolnost, závratě, ztuhlost šíje a změnu psychického stavu (Young a Thomas, 2018). Infekce močových cest a bakteriémie jsou hlavními důsledky infekcí způsobených bakterií *K. pneumoniae* (Podschn a Ullmann, 1998).

2.10 Léčba

Vzhledem k nízkému výskytu *K. pneumoniae* v komunitě by se léčba pneumonie měla řídit standardními pokyny pro antibiotickou terapii. Jakmile je infekce *K. pneumoniae* v podezření nebo je potvrzená, antibiotická léčba by měla být přizpůsobena citlivosti na antibiotika. Současné režimy pro komunitně získanou pneumonii způsobenou *K. pneumoniae* zahrnují dvoutýdenní léčbu buď cefalosporinem třetí nebo čtvrté generace v monoterapii nebo respiračním chinolonem v monoterapii

nebo některým z předchozích režimů ve spojení s aminoglykosidy. Pokud je pacient alergický na penicilin, měla by být podána léčba aztreonamem nebo respiračním chinolonem. U nozokomiálních infekcí může být karbapenem použit jako monoterapie (Ashurst, 2022).

V případě diagnostikované ESBL – širokospektré betalaktamázy (enzymy produkované některými mikroby, které hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy; jsou inhibovány inhibitory b-laktamáz (např. klavulanovou kyselinou), nehydrolyzují karbapenemy a obvykle ani cefamyciny (např. cefoxitin) (Hrabák, 2008)), by měla být zahájena léčba karbapenemem vzhledem k míře jeho citlivosti na celém světě. Léčba CRE (karbapenem rezistentní *enterobacteriaceae*) zahrnuje antibiotika ze třídy polymyxinů, tigecyklin, fosfomycin, aminoglykosidy nebo karbapenemy s duální léčbou. Kombinovaná terapie dvou či více činidel může snížit mortalitu ve srovnání se samotnou monoterapií (Ashurst, 2022).

2.11 Způsoby detekce

2.11.1 Mikroskopie

Jelikož se jedná o gramnegativní tyčinky, barví se bakterie rodu *Klebsiella* Gramovým barvením růžově. Některé enterobakterie bývají výrazněji zbarvené u pólů než uprostřed, čímž mohou vytvářet dojem, že se nejedná o tyčinku, ale o dva koky (Zahradníček, 2012).

2.11.2 Kultivace

Kultivace na krevním agaru tvoří bílé kolonie, které se od kolonií stafylokoků a enterokoků odlišují vodovější konzistencí a větší velikostí (Zahradníček, 2012).

K. pneumoniae je nehemolytická pro lidské červené krvinky, avšak bylo zjištěno, že je hemolytická pro králičí krevní agar (Sharma et al., 2015).

Endova půda je selektivní pro enterobakterie, *vibrionaceae* a gramnegativní nefermentující tyčky (Zahradníček, 2012). *K. pneumoniae* je bakterie fermentující laktózu (Cabelli, 1953), což vede k tvorbě načervenalých (růžových) kolonií (Zahradníček, 2012).

2.11.3 Serologie

Stanovují se koncentrace IgA a IgM protilátek proti *K. pneumoniae* v séru za využití metody ELISA (Soto et al., 2016). Základním principem metody ELISA je použití enzymu k detekci vazby antigenu (Ag) a protilátky (Ab). Enzym převádí bezbarvý substrát (chromogen) na barevný produkt, indikující přítomnost vazby antigen–protilátka (Ma et al, 2006).

2.11.4 MLST

Multilokusová sekvenční typizace (MLST) je metoda založená na nukleotidové sekvenci (Diancourt, 2005). MLST poskytuje standardizovaný reprodukovatelný systém pro identifikaci kmenů a nomenklaturu pro daný druh (Maiden, 2006). Veřejně dostupná databáze hostovaná v institutu Pasteur zahrnuje schéma MLST se sedmi lokusy (pozicemi na chromozomech), které tvoří základ nomenklatury klinicky důležitých klonálních skupin pro *K. pneumoniae*. Pomocí MLST lze odlišit bakterii *K. pneumoniae* od příbuzných bakterií jako *K. variicola* nebo *K. quasipneumoniae*. Srovnání sekvencí těchto tří druhů ukázalo, že se vzájemně liší průměrnou nukleotidovou divergencí o 3 – 4 % (Wyres et al, 2016).

2.11.5 PCR a její modifikace

Metody PCR v reálném čase jsou oproti standardní PCR rychlejší a zajišťují specifitu za použití sond (Hartman et al., 2009). Pro amplifikaci sekvence specifické pro *K. pneumoniae* jsou potřeba primery komplementární k jedinečné nukleotidové sekvenci genomu *K. pneumoniae* (Liu et al., 2008). Byly vyvinuty testy druhově specifické pro *K. pneumoniae* detekující geny pro hemolysin, či geny, které jsou vysoce asociované s fenotypem HMV u hypermukoviskozních (HMV) kmenů *K. pneumoniae* (Hartman et al., 2009).

Možné je použití multiplexní PCR k detekci kapsulárních typů K1, K2, K5 (Turton et al., 2008), K20, K54 a K57 (Turton et al., 2010), důležitých faktorů virulence, pomocí sérotypově specifických cílů (Turton et al., 2008).

3 Metody

3.1 Izolace DNA

Izolace DNA je první fází většiny metod. Jejím cílem je získání dostatečného množství DNA či RNA v co nejčistším stavu. Kvalita extrahovaného materiálu je důležitá pro získání spolehlivých výsledků v navazujících postupech (Beránek, 2016).

Metody izolace nukleových kyselin využívají:

1. rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul
2. adsorpce na pevný podklad
3. ultracentrifugace v gradientních roztocích

Výběr metody extrakce DNA závisí na způsobu následné analýzy. Požadavky na množství a integritu nukleové kyseliny se mohou u různých metod lišit, např. pro PCR reakci stačí jen malé množství vstupního materiálu, zatímco pro podrobné genetické analýzy je potřeba dostatečné zásobní množství nukleové kyseliny (Šmarda et al., 2005).

3.1.1 Lyze buněk

Prvním předpokladem je dostupnost vstupního materiálu (bakteriální kultury, vzorky tkání aj.). Vstupní materiál by měl být čerstvý, zmražený nebo lyofilizovaný, aby nedošlo k degradaci nukleových kyselin enzymy přítomnými v buněčném extraktu (Šmarda et al., 2005).

Pro uvolnění buněčného obsahu je potřeba vyvolat lyzi buněčné stěny. Stěny bakteriálních buněk jsou obvykle rozrušovány lysozymem (tento enzym se přirozeně vyskytuje ve vaječném bílku) (Gill et al., 2016). Spolu s lysozymem jsou používány detergenty pro rozpouštění cytoplazmatické membrány (např. laurylsíran sodný) a chelatační činidla (např. EDTA), která vážou dvojmocné kationty a destabilizují tak vnější bakteriální membránu a zároveň inhibují deoxyribonukleázy (Ares, 2012).

Po rozrušení buněčné stěny a plazmatické membrány vzniká komplexní směs DNA, RNA, proteinů, lipidů, sacharidů a uhlovodíků (Beránek, 2016).

3.1.2 Neutralizace nežádoucích látek

Pro odstranění RNA se využívají ribonukleázy (RNázy), které jsou stabilní i za vyšších teplot. Je možné je zahřát na 65 °C a odstranit tak stopy deoxyribonukleáz poškozujících DNA.

Pro odstranění proteinů se využívají proteázy. Buňky obsahují řadu enzymů, které způsobují degradaci nukleových kyselin, dále také proteiny, které se mohou na DNA

navázat a snížit tak účinnost následujících postupů, což je zásadním důvodem pro jejich odstranění (Tan a Yiap, 2009).

3.1.3 Metody izolace

3.1.3.1 Fenol-chloroformová extrakce

Směs fenolu a chloroformu je nemísitelná s vodou. Po jejím přidání do vodného prostředí buněčného lyzátu tak způsobí tvorbu dvou fází. Po promíchání dojde k denaturaci proteinů, jejich vysrážení a následnou centrifugací se sraženina oddělí od lehčí vodné fáze (Tan a Yiap, 2009).

3.1.3.2 Etanolová precipitace

Vodný roztok nukleové kyseliny zbavený proteinů po fenol-chloroformové extrakci je potřeba zbavit stop fenolu a chloroformu. Obzvláště fenol ponechaný v roztoku by mohl způsobit nežádoucí denaturaci enzymů při následných postupech (Figueroa-Bossi et al., 2022).

Pomocí precipitace (srážení) alkoholem je možné převést NK do malého objemu a zajistit její přečištění. Nejčastěji je využit etanol či izopropanol. Nukleové kyseliny je možné srážet do podoby agregátu za přítomnosti jednomocných iontů (např. Na^+ , K^+ , NH_4^+). Agregát při centrifugaci sedimentuje na dno zkumavky. Soli lze srážet společně s NK a z precipitátu je odstranit promytím 70% etanolem. Po odpaření etanolových par dojde k opětovnému rozpuštění DNA ve vodném roztoku.

Roztok DNA je obvykle uchováván při 4 °C (Šmarda et al., 2005).

3.1.3.3 Kolonková metoda

Izolace DNA pomocí komerčně dostupných kitů obsahujících plastové kolonky, lyzační, promývací a eluční pufrů (Tagliaferro et al., 2021).

Uvnitř kolony se nachází vrstva modifikovaného silikagelu, která slouží k zachycování nukleové kyseliny. Lyzační pufrů často obsahují kationické detergenty pro rozrušení biologických membrán buněk a dále chaotropní látky snižující polaritu rozpouštědel a zvyšující rozpustnost bílkovin. Chaotropní soli narušují hydratační vrstvu, NK se tak váže na nehydratovaný silikagel. Centrifugací za přítomnosti promývacích pufrů je lyzáat promýván a jsou z něj odstraňovány nežádoucí látky. Eluční pufr obnovuje vazbu vody a NK a hydratuje silikagel. NK se tak vyváže z vrstvy silikagelu a je zachycena do sběrné zkumavky (Beránek, 2016).

3.2 PCR

Polymerázová řetězová reakce, zkráceně PCR, je základní molekulární metoda, objevená Kary B. Mullisem, který za její vývin získal v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii (Mullis, 1994). PCR byla inovativní metodou, jež pomohla k rychlému rozvoji molekulární biologie. Jedná se o metodu, která umožňuje amplifikaci specifické sekvence nukleové kyseliny in vitro (Bell, 1989).

PCR může být provedena s použitím zdrojové DNA z různých druhů tkání a organismů, včetně periferní krve, vlasů, kůže, slin a mikrobů. Postačující je pouze stopové množství DNA pro vytvoření dostatečného množství kopií pro analýzu konvenčními laboratorními metodami. Z tohoto důvodu je PCR považována za metodu s vysokou citlivostí.

Každá PCR reakce vyžaduje přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů a DNA polymerázy.

DNA polymeráza je klíčovým enzymem umožňujícím napojování nukleotidů a tím vznik PCR produktu (Gariban, 2013). Vzhledem k tomu, že je nutné zvýšit teplotu k oddělení řetězců dvouvláknové DNA v každém kole amplifikačního procesu, hlavním krokem vpřed se stal objev termostabilní DNA polymerázy (*Taq* polymeráza), která byla izolována z *Thermus aquaticus* – bakterie, která se vyskytuje ve vodě a půdě v hypertermálním prostředí. V důsledku toho není nutné přidávat novou polymerázu v každém kole amplifikace (Hunt, 2006).

Nukleotidy zahrnují 4 báze – adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G). Tyto báze se párují dle pravidel komplementarity, tedy adenin s thyminem a cytosin s guaninem.

Primery jsou uměle vytvořené, krátké řetězce DNA (obvykle 18–25 bp) (Weier a Gray, 1988). Pořadí bází v primeru určuje, která sekvence nukleové kyseliny bude amplifikována, a to na základě jejich vzájemné komplementarity. Primer nasedá na templátovou DNA v místě, kde se naváže DNA polymeráza, která umožní syntézu nového řetězce (Rahman et al., 2013).

Kritickým parametrem pro design primeru je jeho délka (Wu et al, 1991). Obecně jsou nejvhodnější primery o délce 17–34 nukleotidů. U primerů kratších hrozí nedostatečná specifita vůči požadované sekvenci DNA. Nejvíce specifické primery mají délku 18–24 nukleotidů (Dieffenbach, 1993). Jako optimální teplota tání (T_m) primeru se uvádí 52–58 °C (Abd-Elsalam, 2003). Důležitou charakteristikou nukleové

kyseliny je i obsah bází GC, jejich množství informuje o síle annealingu a mělo by dosahovat 45–60 % (Dieffenbach et al., 1993).

Výše zmíněné komponenty jsou následně namíchány do reakční zkumavky, která je umístěna do thermocycleru, tedy do stroje umožňujícího cyklické opakování jednotlivých fází polymerázové řetězové reakce. Thermocycler po umístění zkumavek postupně zvyšuje a snižuje teplotu dle předem nastaveného programu (Weier a Gray, 1988).

První fází je denaturace, tedy rozdělení dvou vláken DNA vlivem rostoucí teploty, která je zvýšena na 94 °C po dobu 1–2 minut. Při teplotě nad 80 °C nemohou být udržovány vodíkové můstky a dvouvláknová DNA (dsDNA) se denaturuje na jednovláknovou DNA (ssDNA).

Druhou fází je annealing prováděný při teplotě mezi 40–70 °C po dobu 30–60 sekund. Snížení teploty umožňuje reformaci vodíkových vazeb a nasedání specifických primerů na cílové segmenty DNA. Navázání specifických primerů a cílové DNA může nastat pouze v případě jejich vzájemné komplementarity. Čím vyšší je teplota nasedání primeru, tím specifičtější a selektivnější primer je.

Třetí fází je elongace. Teplota se v této fázi zvyšuje na 72 °C na 2–5 minut a dochází při ní k syntéze komplementárního vlákna. *Taq* polymeráze váže na ssDNA s navázaným primerem a katalyzuje replikaci pomocí deoxyribonukleosidtrifosfátů přítomných v reakční směsi. Úseky templátové DNA jsou směrem od primerů syntetizovány. Syntéza analyzovatelného množství DNA trvá 20–40 cyklů, v každém cyklu se množství kopií zdvojnásobí.

Pro vizualizaci PCR produktu se využívá elektroforéza (Kadri, 2020).

3.3 Elektroforéza

Elektroforéza je instrumentální technika umožňující separaci, identifikaci a purifikaci nukleových kyselin na základě jejich rozdílné mobility ve stejnosměrném elektrickém napětí (Beránek, 2016).

Elektroforéza na agarózovém gelu je velmi účinným způsobem separace fragmentů DNA různých velikostí v rozmezí od 100 bp do 25 kbp.

Agaróza je izolována u mořských řas rodů *Gelidium* a *Gracilaria* a skládá se z opakovaných agarobiózových (L- a D-galaktózových) podjednotek. Během gelovatění se agarózové polymery nekovalentně spojují a tvoří síť. Velikost pórů určuje vlastnosti gelu jakožto molekulárního síta.

Pro separaci DNA pomocí elektroforézy na agarózovém gelu se DNA napipetuje do předem odlitých jamek v gelu a aplikuje se proud. Fostátová kostra DNA (a RNA) je záporně nabitá, proto při umístění do elektrického pole budou fragmenty DNA migrovat směrem ke kladně nabitě anodě.

Molekuly DNA jsou v agarózovém gelu odděleny podle velikosti tak, že ujetá vzdálenost je nepřímě úměrná logaritmu molekulové hmotnosti.

Rychlost migrace molekuly DNA přes gel je určena: velikostí molekul DNA, koncentrací agarózy, konformací DNA, použitým napětím, přítomností ethidium bromidu, typem agarózy a elektroforetickým pufrům. (Lee et al., 2012)

Po separaci mohou být molekuly DNA vizualizovány pod UV světlem po obarvení vhodným interkalačním barvivem (ethidium bromid), které se při klasické elektroforéze smíchá se vzorkem nebo je přidán do agarózového gelu v průběhu jeho přípravy (Beránek, 2016).

3.4 Real-time PCR

Real-time PCR, neboli polymerázová řetězová reakce v reálném čase, je založena na detekci fluorescenčního signálu produkovaného během amplifikace templátové DNA. Na rozdíl od end point PCR, real-time PCR zaznamenává množství amplifikované DNA v každém cyklu (v reálném čase) (Bustin, 2005). Lze tak kombinovat amplifikaci DNA a detekci amplifikačních produktů bez potřeby gelové elektroforézy (Bustin, 2000).

Přístroj pro real-time PCR se skládá z termocycleru s integrovaným zdrojem excitačního světla (lampa, laser nebo LED: světlo emitující dioda), fluorescenčního detekčního systému nebo fluorimetru a softwaru, který zobrazuje zaznamenaná fluorescenční data jako křivku amplifikace DNA. Je nutné přidat do reakční směsi interkalační barvivo dsDNA nebo fluoroforem značenou sondu (Navarro, 2015).

Nespecifické zdroje fluorescence:

- SYBR Green
- Ethidium bromid
- Eva Green
- Nespecifická interkalační činidla se váží pouze na dsDNA, což vede k jejich fluorescenci. Detekují specifické i nespecifické amplifikační produkty.

Specifické zdroje fluorescence:

- Molecular beacon probes – Během annealingu se Beacon sonda rozvine a naváže na cílovou sekvenci DNA, což vede k emisi fluorescenčního záření

- TaqMan sondy – V roztoku je fluorescenční signál zhasen v důsledku skutečnosti, že dva fluorofory sondy jsou v těsné blízkosti. Ve fázi elongace je navázaná hydrolyzační sonda degradována 5'-3'-exonukleázovou aktivitou DNA polymerázy, což generuje fluorescenci z reportéru.
- Scorpion sondy – Po navázání sondy na cílový úsek DNA, zkopíruje DNA polymeráza cílovou sekvenci. V další fázi denaturace se specifická sekvence sondy váže na komplementární oblast ve stejném řetězci nově amplifikované DNA, což vede k emisi fluorescenčního záření.
- Specifické zdroje fluorescence využívají fluorofory připojené k oligonukleotidům a detekují pouze specifické produkty PCR (Navarro, 2015).

U real-time PCR využívající vazbu SYBR green na amplifikovanou DNA měříme nárůst fluorescence, jak se barvivo váže na rostoucí množství DNA v reakční zkumavce. Toto zvýšení fluorescence pochází buď z DNA, kterou chceme měřit, nebo může část signálu pocházet z jiné DNA než z námi cílené. Jedním ze způsobů, jak provést určitou kontrolu produktů, je provést křivku tání (Hunt, 2006).

Princip TaqMan real-time PCR je založen na štěpení sondy exonukleázovou aktivitou *Taq* polymerázy během amplifikace. Sonda obsahuje fluorescenční reportér na 5' konci a zhasací barvivo na 3' konci. Na začátku reakce nedochází k fluorescenci kvůli blízkosti zhasacího barviva a fluorescenčního reportéru (Désiré et al., 2001). Po denaturaci DNA a po nasednutí primerů se sonda specificky naváže na cílovou DNA. Během syntézy komplementárního řetězce *Taq* polymeráza narazí na TaqMan sondu a rozštěpí ji svou endonukleázovou aktivitou. Tím dochází k uvolnění fluorochromu, jeho vzdálení od zhasáče a k emisi fluorescenčního záření, které je následně zaznamenáno termocyclerem.

TaqMan sondy se specificky vážou na každý cíl, tím pádem nedochází k detekci nescifických produktů. Nevýhodou TaqMan sond je jejich cena, jelikož pro každý cíl je nutné syntetizovat specifickou sondu (Fattahi et al., 2017).

Cyklus, při kterém intenzita emise záření zdroje fluorescence stoupá nad šum pozadí, se označuje jako prahový cyklus (Ct) (Valasek, 2005). Všechny metody pro měření Ct jsou založeny na fluorescenčním monitorování tvorby amplikonové DNA (Rutledge et al., 2003). Ct je stanovena v exponenciální fázi PCR reakce a je nepřímo úměrná počtu kopií cílové sekvence DNA. Proto čím vyšší je počáteční počet kopií cílené nukleové kyseliny, tím dříve je pozorován významný nárůst fluorescence a tím nižší je Ct (Bustin,

2005). Finální produkt lze charakterizovat teplotou, při které dvoušroubovice disociuje (melting curve, stanovuje se u SYBR green real-time PCR). Čím vyšší je teplota tání, o specifitější produkt se jedná. Tato teplota tání je závislá na délce produktu a uspořádání nukleotidů (Valasek, 2005).

Stroj v reálném čase nejen monitoruje syntézu DNA během PCR, ale také určuje bod tání produktu na konci amplifikačních reakcí. Teplota tání dvoušroubovice DNA závisí na jejím základním složení a délce. Všechny produkty PCR pro konkrétní pár primerů by měly mít stejnou teplotu tání. Protože SYBR green nerozlišuje mezi jednou DNA a druhou, důležitým prostředkem kontroly kvality je kontrola, že všechny vzorky mají podobnou teplotu tání, a tedy nevznikají nespecifické produkty či primery-dimery. Po amplifikaci PCR v reálném čase lze stroj naprogramovat tak, aby provedl křivku tání, při níž se teplota zvýší o zlomek stupně a měří se změna fluorescence. Při teplotě tání se dva řetězce DNA oddělí a fluorescence rychle klesá. Software vykresluje změnu fluorescence na ose y proti rostoucí teplotě na ose x. Má-li křivka dva či více vrcholů, dochází v reakci k amplifikaci nespecifických produktů (Hunt, 2006).

Absolutní kvantifikace lze dosáhnout pomocí standardní křivky, vytvořené amplifikací známých množství cílové DNA. Vyjadřuje vztah C_t vzhledem k množství vstupní DNA. Příprava standardní křivky je náročná na práci a náchylná k chybám, přičemž kvantitativní přesnost závisí jak na přesnosti standardní kvantifikace DNA, tak na kvalitě konstrukce standardní křivky (Rutledge et al., 2003).

Ke konstrukci standardní křivky se využívá ředící řada. Standardní křivku vytváří lineární vztah mezi C_t a počátečním množstvím DNA. Pro konstrukci standardní křivky PCR lze použít fragment dvouřetězcové DNA (dsDNA), jednořetězcové DNA (ssDNA) nebo cRNA obsahující cílovou sekvenci (Jia, 2012).

Sklon standardní křivky je měřítkem efektivity reakce. 100% efektivita reakce PCR odpovídá sklonu standardní křivky $-3,32$. Efektivitu reakce lze vypočítat podle vzorce: $E = [10(-1/\text{slope})]^{-1}$, kde slope je sklon standardní křivky (Jia, 2012). Je-li sklon standardní křivky nižší než $-3,32$, efektivita reakce byla menší než 100 %. Naopak sklon vyšší než $-3,32$ značí nízkou kvalitu vzorku či chybu vzniklou v průběhu přípravy reakce. 100 % efektivita PCR reakce znamená exponenciální nárůst PCR produktu každých 3,32 cyklu (Labguide, ©2014-2019).

4 Cíl práce

Hlavním cílem této bakalářské práce je optimalizace metody real-time PCR nalezením specifických primerů (popř. sond) pro detekci bakterie *K. pneumoniae* s využitím vědeckých článků a sekvencí DNA pro gen *phoE* z databáze NCBI, následné otestování primerů na vzorcích čisté kultury *K. pneumoniae*, porovnání přesnosti a citlivosti detekčních metod PCR a verifikace na vzorcích stěrů z bukální sliznice. Dalšími cíli je stanovení specificity a sensitivity detekčních metod PCR v závislosti na jejich rutinním používání, stanovení jejich detekčních limitů a porovnání.

5 Materiál a metody

5.1 Bakteriální kmeny

Název	Sbírka	Číslo sbírky
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	DSMZ	13414
<i>Citrobacter rodentium</i>	DSMZ	16696
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	DSMZ	20755
<i>Helicobacter mastomyrinus</i>	DSMZ	22886
<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSMZ	5175
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSMZ	4799
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	DSMZ	22144
<i>Pasteurella multocida</i>	DSMZ	5282
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	DSMZ	5281
<i>Pasteurella pneumotropicus</i>	DSMZ	21403
<i>Proteus mirabilis</i>	DSMZ	28629
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSMZ	939
<i>Rodentibacter heidelbergensis</i>	DSMZ	103978
<i>Rodentibacter pneumotropicus</i>	DSMZ	21403
<i>Rodentibacter rattii</i>	DSMZ	103977
<i>Salmonella</i> spp.	DSMZ	554
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSMZ	799
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	DSMZ	12112
<i>Streptococcus agalactiae</i>	DSMZ	2134
<i>Streptococcus canis</i>	DSMZ	20715
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	DSMZ	23147
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	DSMZ	20727
<i>Streptococcus mitis</i>	DSMZ	12643
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSMZ	11868
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	DSMZ	18670
<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSMZ	20565

Tabulka 1: Seznam bakteriálních kmenů ze sbírky DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) využitých pro testování specifity použitých primerů pro SYBR green a TaqMan real-time PCR.

5.2 *Izolace DNA*

Izolace DNA byla provedena ze vzorků bukálních stěrů prostřednictvím komerčně dostupného kitu RIDA[®] Xtract. Samotná extrakce DNA byla provedena vedoucí této bakalářské práce Ing. Dagmar Stehlíkovou, Ph.D.

5.3 *SYBR Green real-time PCR*

Primery

Pro SYBR Green real-time PCR byly použity primery navržené v programu Primer Premier 5TM pro gen *PhoE* (phosphoporin PhoE – gen kódující poriny, bílkoviny, přítomné v cytoplazmatické membráně bakterie *K. pneumoniae*, podílející se na regulaci účinku antibiotik, jejich vniku do buňky a vzniku antibiotické rezistence) bakterie *K. pneumoniae* (Sun et al., 2010), syntetizovány firmou Integrated DNA technologies.

Sekvence forward: TGCCCAGACCGATAACTTTA (směr na vlákně 5'→3')

Sekvence reverse: CTGTTTCTTCGCTTCACGG (směr na vlákně 5'→3')

Reakční směs

Složení reakční směsi SYBR Green real-time PCR pro každý vzorek o celkovém objemu 10 µl bylo následující: 7 µl Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystems, USA); 1 µl DEPC water Ultra pure (Thermo Fisher, USA); 0,5 µl forward a 0,5 µl reverse primerů o koncentraci 10 µM (Integrated DNA technologies, USA); 1 µl bakteriální DNA. Pro každou reakci byla připravena negativní kontrola, tedy vzorek se stejným složením bez bakteriální DNA.

Reakční cyklus

Real-time PCR reakce probíhaly v termocycleru Quant studio 6 Flex (Applied biosystems, USA) dle následujícího programu, kroky 2–4 se opakovaly 40x. Rychlost nárůstu a poklesu teploty byla 1,6 °C/s.

Krok	Fáze	Teplota	Čas
1.	Hold stage	95 °C	10 min
2.	Denaturace	95 °C	15 s
3.	Annealing	57 °C	1 min
4.	Křivka tání	60–95 °C	

Tabulka 2: Reakční cyklus SYBR Green real-time PCR.

Sensitivita

Pro stanovení sensitivity byla použita *K. pneumoniae* 4799 ze sbírky DSMZ o koncentraci 307 ng/μl. Koncentrace byla změřena na spektrometrickém zařízení NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Izolát byl rozředěn v desítkovém ředění do ředící řady v poměru 18 μl DEPC water a 2 μl izolátu. Byl stanoven detekční limit reakční směsi.

Ředící řada izolátu DNA bakterie *K. pneumoniae* byla otestována metodou SYBR green real-time PCR za použití primerů navržených k detekci genu *phoE*.

Melting curve

Analýza melting curve byla provedena po fázi annealing. Teplota byla zvýšena na 95 °C, poté snížena na 60 °C s následným vzestupem na 95 °C, monitorování fluorescence probíhalo při teplotě 95 °C.

Melting curve zobrazuje změnu intenzity fluorescence při různých teplotách. Lze tak vyhodnotit specifickou reakci.

Specifita

Pro stanovení specifity bylo použito 26 izolátů bakteriální DNA ze sbírky DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, viz Tabulka 1).

Verifikace metody

Pro verifikaci metody bylo použito 41 izolátů z bukálních stěrů z oblasti předpokládaného výskytu *K. pneumoniae*.

5.4 TaqMan Real-time PCR

Primery a sonda

Pro TaqMan real-time PCR byly použity primery navržené v programu Primer Express™ pro gen *PhoE* bakterie *K. pneumoniae* (Stehlíková, nepublikováno), syntetizovány firmou Generi biotech.

Sekvence forward: CCTACCGCAACACCGACTTC (směr na vlákne 5' → 3')

Sekvence reverse: GGTACTGCAGGGTCAGATCCA (směr na vlákne 5' → 3')

Pro TaqMan real-time PCR byla použita sonda typu FAM-BHQ1 (Stehlíková, nepublikováno), syntetizována firmou Generi biotech.

Sonda: FAM-TCGGTCTGGTGGATGG-BHQ1

Reakční směs

Složení reakční směsi TaqMan real-time PCR pro každý vzorek o celkovém objemu 10 µl bylo následující: 7 µl Master Mix Light Cycler 480 probes master (Roche, CZ); 1,2 µl DEPC water Ultra pure (Thermo Fisher, USA); 0,3 µl forward a 0,3 µl reverse primerů o koncentraci 10 µM (Generi biotech, CZ); 0,2 µl TaqMan sonda (Generi biotech, CZ); 1 µl bakteriální DNA. Pro každou reakci byla připravena negativní kontrola, tedy vzorek se stejným složením bez bakteriální DNA.

Reakční cyklus

Real-time PCR reakce probíhaly v termocycleru Quant studio 6 Flex (Applied biosystems, USA) dle následujícího programu, kroky 2–3 se opakovaly 40x. Rychlost nárůstu a poklesu teploty byla 1,6 °C/s.

Krok	Fáze	Teplota	Čas
1.	Hold stage	95 °C	10 min
2.	Denaturace	95 °C	15 s
3.	Annealing	57 °C	1 min

Tabulka 3: Reakční cyklus TaqMan real-time PCR.

Sensitivita

Pro stanovení sensitivity byla použita *K. pneumoniae* 4799 ze sbírky DSMZ o koncentraci 307 ng/µl. Koncentrace byla změřena na spektrometrickém zařízení NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Izolát byl rozředěn v desítkovém ředění do ředící řady v poměru 18 µl DEPC water : 2 µl izolátu.

Ředící řada izolátu DNA bakterie *K. pneumoniae* byla otestována metodou TaqMan real-time PCR za použití primerů navržených k detekci genu *phoE*.

Specificita

Pro stanovení specificity byly použity izoláty bakteriální DNA *K. pneumoniae* 4799 a *K. oxytoca* 5175 ze sbírky DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; viz Tabulka 4. Seznam bakteriálních kmenů ze sbírky DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) využitých pro otestování specificity použitých primerů pro SYBR green a TaqMan real-time PCR).

Verifikace

Pro verifikaci a porovnání byly použity stejné vzorky jako u SYBR Green real-time PCR metody.

5.5 End point PCR

Primery

Pro end point PCR byly použity primery navržené v programu Primer Premier 5 pro gen *PhoE* bakterie *K. pneumoniae* (Sun et al., 2010), syntetizovány firmou Integrated DNA technologies.

Sekvence forward: TGCCCAGACCGATAACTTTA (směr na vlákně 5'→3')

Sekvence reverse: CTGTTTCTTCGCTTCACGG (směr na vlákně 5'→3')

Reakční směs

Složení reakční směsi End Point PCR pro každý vzorek o celkovém objemu 25 µl bylo následující: 12,5 µl PPP Master Mix (Top Bio, CZ); 9,5 µl PCR H₂O (Top Bio, CZ); 1 µl forward a 1 µl reverse primerů o koncentraci 10 µM (Integrated DNA technologies, USA); 1 µl bakteriální DNA. Pro každou reakci byla připravena negativní kontrola, tedy vzorek se stejným složením bez bakteriální DNA.

Reakční cyklus

PCR reakce probíhaly v termocycleru Tprofessional termocycler (Biometra, DE) dle následujícího programu, kroky 2–4 se opakovaly 35x.

Krok	Fáze	Teplota	Čas
1.	Počáteční denaturace	94 °C	1 min
2.	Denaturace	94 °C	15 s
3.	Annealing	57 °C	15 s
4.	Elongace	72 °C	30 s
5.	Konečná elongace	72 °C	7 min
6.	Chlazení	4 °C	

Tabulka 4: Reakční cyklus end point PCR.

Sensitivita

Pro stanovení sensitivity byla použita *K. pneumoniae* 4799 ze sbírky DSMZ o koncentraci 307 ng/µl. Koncentrace byla změřena na spektrometrickém zařízení NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Izolát byl rozředěn v desítkovém ředění do ředící řady v poměru 18 µl DEPC water a 2 µl izolátu. Byl stanoven detekční limit reakční směsi.

Ředící řada izolátu DNA bakterie *K. pneumoniae* byla otestována metodou SYBR green real-time PCR za použití primerů navržených k detekci genu *phoE*.

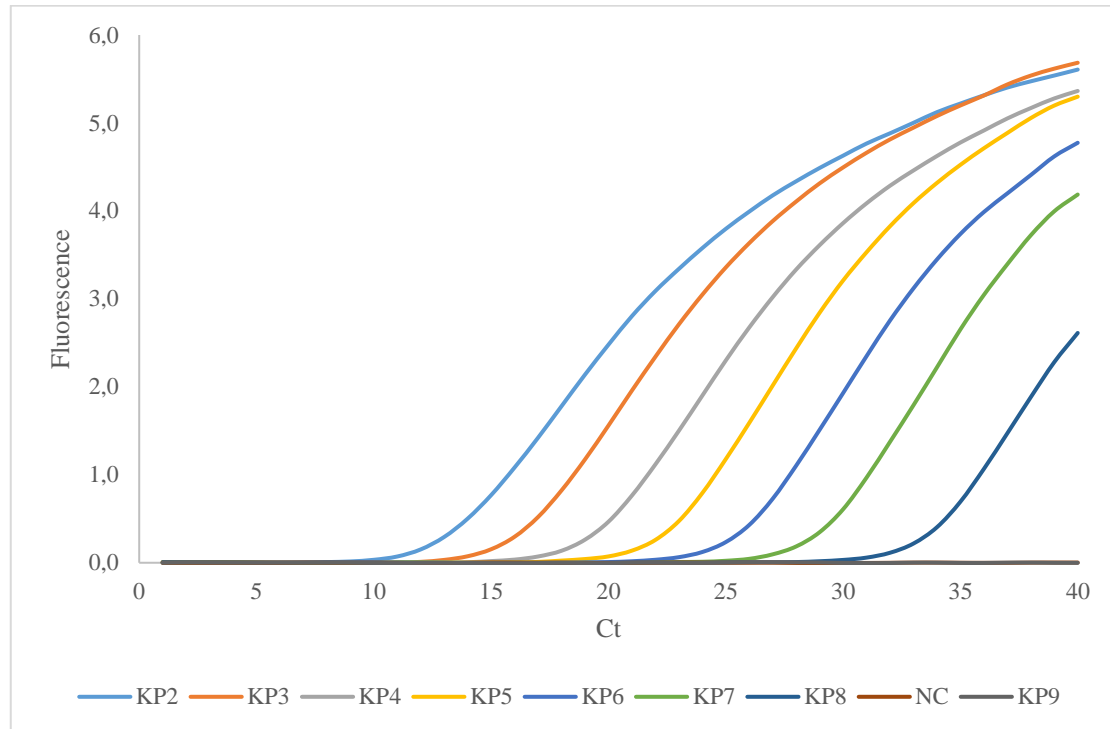
5.6 Elektroforéza

Vizualizace produktů End Point PCR byla provedena pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. Pro vizualizaci produktů byl připraven 2% agarózový gel (2,1 g agarózy + 100 ml Tris-borate-EDTA (TBE)). Jako obarvující činidlo bylo použito 4 μ l Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, USA). Výsledný gel byl přelit do vany s hřebínky, kde se nechal ztuhnout. Gel byl následně přesunut do elektroforetické nádoby. Do jamek bylo napipetováno po 15 μ l vzorků. Pro porovnání velikosti fragmentů sledované DNA byl použit 100 bp DNA ladder (New England BioLabs, USA). Separace probíhala při nastavení na 90 V po dobu 40 minut. Po ukončení separace byl gel prosvěcován UV zářením pomocí přístroje InGenius3 (Syngene, GB).

6 Výsledky

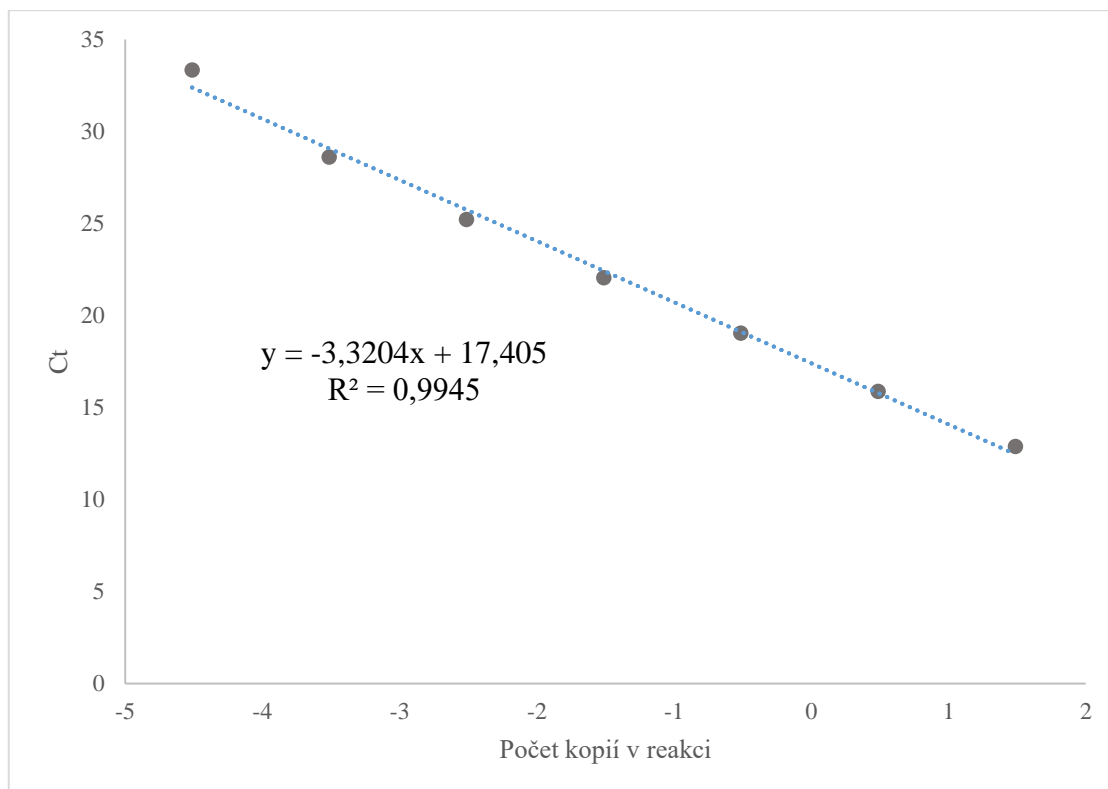
6.1 SYBR Green real-time PCR

Sensitivita a účinnost



Graf 1: Amplifikační křivky ředící řady izolátu DNA bakterie *K. pneumoniae*. Počet kopií DNA v jednotlivých ředěních: KP2 = 30,7 ng/μl; KP3 = 3,07 ng/μl; KP4 = 0,307 ng/μl; KP5 = 0,0307 ng/μl; KP6 = 0,00307 ng/μl; KP7 = 0,000307 ng/μl; KP8 = 0,0000307 ng/μl; KP9 = 0,00000307 ng/μl.

Nejnižší koncentrace, při jejíž amplifikaci fluorescence překročila práh detekce (threshold), byla 0,0000307 ng/μl (ředění KP8). Práh detekce byl překročen ve 34. cyklu reakce. Tato koncentrace byla vyhodnocena jako detekční limit, tedy minimální koncentrace DNA, která musí být ve vzorku přítomna, aby došlo k amplifikaci cílové DNA.



Graf 2: Standardní křivka ředící řady izolátu DNA *K. pneumoniae* pro SYBR Green real-time PCR.

Pro ředící řadu byla stanovena standardní křivka pro zhodnocení účinnosti metody. Pro výpočet efektivity reakce byl použit vzorec $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$.

$$\text{Slope} = -3,3204$$

$$E = 10^{(-1/(-3,3204))-1}$$

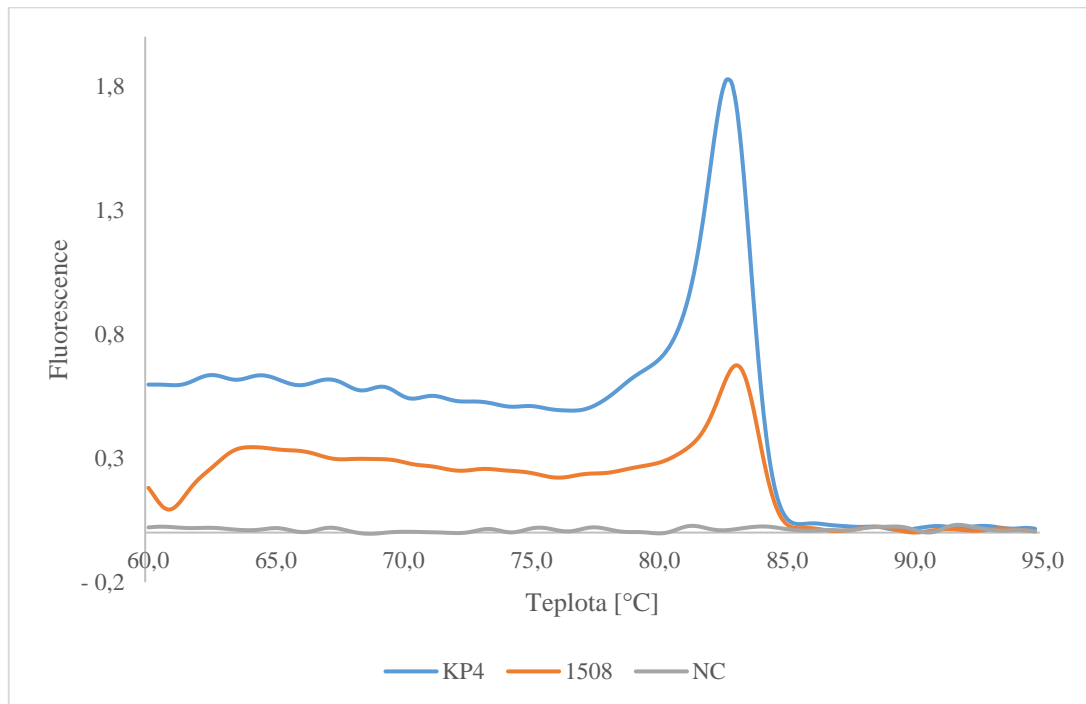
$$E = 1,0006$$

$$\%E = 1,0006 * 100$$

$$\%E = 100 \%$$

Hodnota reakční účinnosti byla stanovena na 100 %, vypočítána ze sklonu amplifikační křivky. Z hodnoty 0,9945 korelačního koeficientu lineární regrese R^2 byla odhadnuta vysoká spolehlivost reakce.

Melting curve



Graf 3: Melting curve (křivka tání) pozitivní kontroly KP4 (0,307 ng/μl), verifikačního vzorku označeného 1508 a negativní kontroly.

Křivky KP4 a vzorku 1508 vykazují nárůst intenzity fluorescence ve srovnatelném rozmezí teplot, nedochází tedy ke vzniku nespecifických produktů.

Specificita

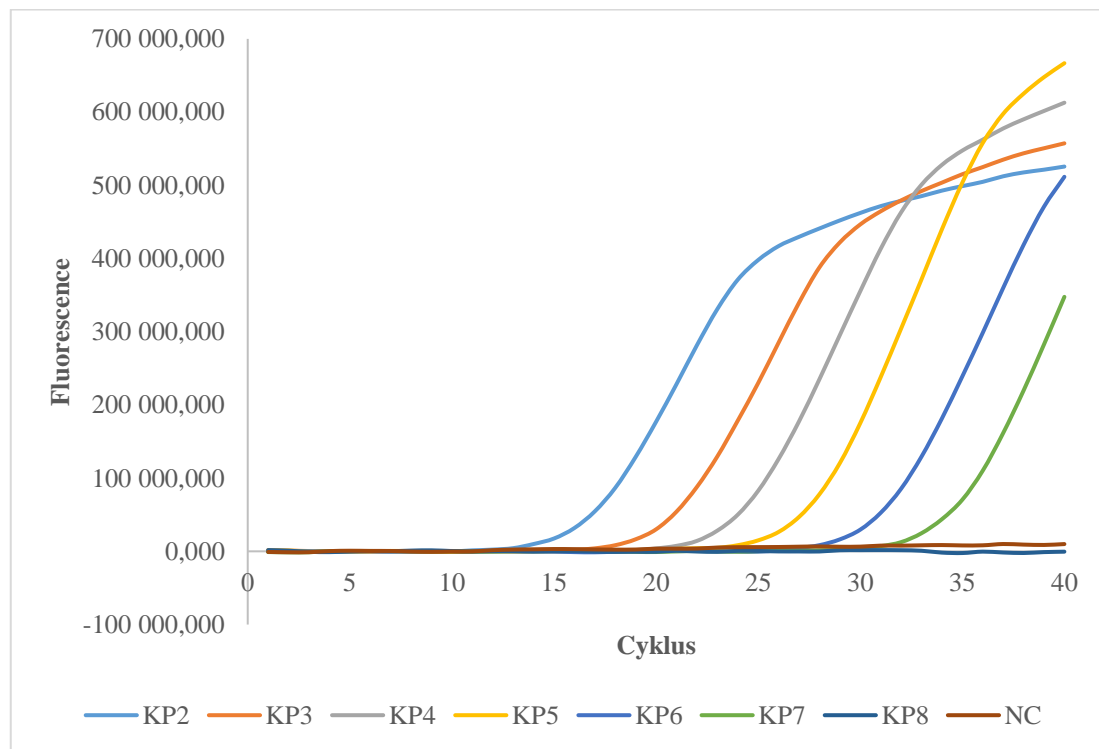
K amplifikaci DNA došlo pouze u izolátu DNA bakterie *K. pneumoniae*. Primery byly tedy vyhodnoceny jako specifické pro *K. pneumoniae* a nedocházelo k jejich navázání ani na blízkce příbuzné bakterie, jako např. *K. oxytoca*.

Verifikace

Křivka tání prokazuje amplifikaci specifických produktů. U 40 vzorků nedošlo k amplifikaci cílové DNA. Pouze v případě jednoho 1508 došlo k amplifikaci cílové DNA, avšak fluorescence překročila práh detekce za detekčním limitem. Všechny 41 vzorků bylo tedy vyhodnoceno jako negativní.

6.2 TaqMan real-time PCR

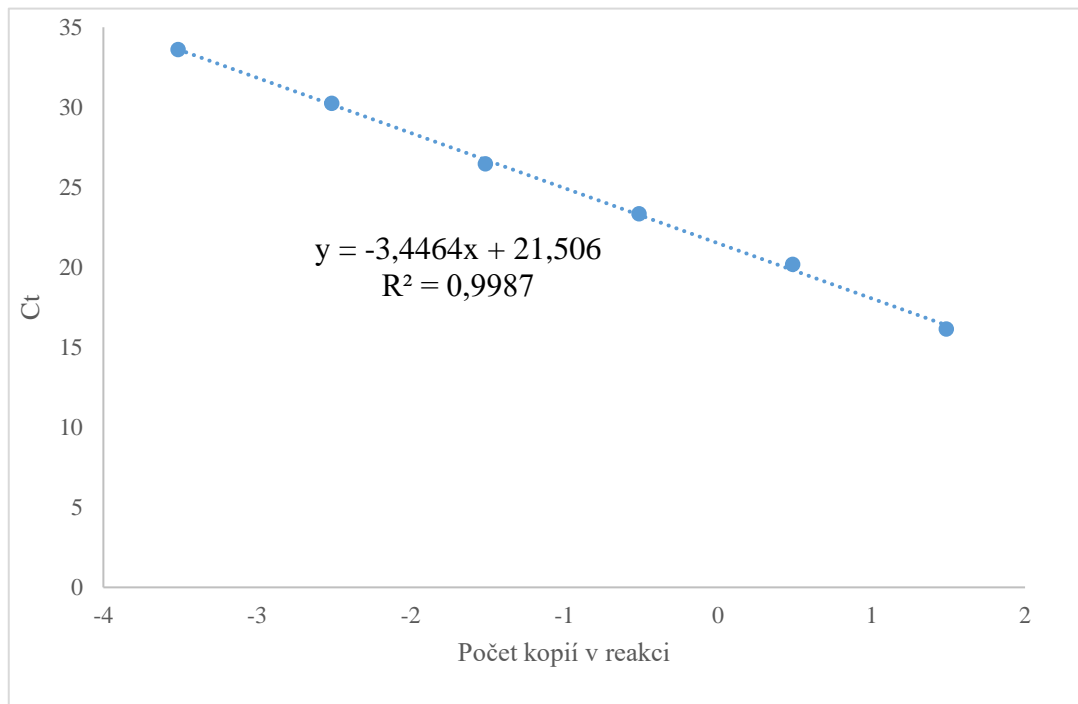
Sensitivita a účinnost



Graf 4: Amplifikační křivky ředící řady izolátu DNA bakterie *K. pneumoniae*. Počet kopií DNA v jednotlivých ředěních: KP2 = 30,7 ng/μl; KP3 = 3,07 ng/μl; KP4 = 0,307 ng/μl; KP5 = 0,0307 ng/μl; KP6 = 0,00307 ng/μl; KP7 = 0,000307 ng/μl; KP8 = 0,0000307 ng/μl.

Nejnižší koncentrace, při jejíž amplifikaci fluorescence překročila práh detekce (threshold), byla 0,000307 ng/μl (ředění KP7). Práh detekce byl překročen ve 34. cyklu reakce. Tato koncentrace byla vyhodnocena jako detekční limit, tedy minimální

koncentrace DNA, která musí být ve vzorku přítomna, aby došlo k amplifikaci cílové DNA.



Graf 5: Standardní křivka ředící řady izolátu DNA *K. pneumoniae* pro TaqMan real-time PCR.

Pro ředící řadu byla stanovena standardní křivka pro zhodnocení účinnosti metody. Pro výpočet efektivity reakce byl použit vzorec $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

$$\text{Slope} = -3,4464$$

$$E = 10^{(-1/(-3,4464))} - 1$$

$$E = 0,9505$$

$$\%E = 0,9505 * 100$$

$$\%E = 95 \%$$

Hodnota reakční účinnosti byla stanovena na 95 %, vypočítána ze sklonu amplifikační křivky. Z hodnoty 0,9987 korelačního koeficientu lineární regrese R^2 byla odhadnuta vysoká spolehlivost reakce.

Specificita

Pro stanovení specifity byly použity izoláty DNA bakterií *K. pneumoniae* a blízké příbuzné bakterie *K. oxytoca* ze sbírky DSMZ (German collection of microorganisms and cell cultures). K amplifikaci DNA došlo pouze u izolátu DNA bakterie *K. pneumoniae*. Primery byly tedy vyhodnoceny jako specifické pro *K. pneumoniae* a nedocházelo k jejich navázání ani na blízké příbuznou bakterii *K. oxytoca*.

Verifikace

U 40 vzorků nedošlo k amplifikaci cílové DNA. Pouze v případě vzorku 1508 došlo k amplifikaci cílové DNA a fluorescence překročila práh detekce ve 28. cyklu. Vzorek 1508 byl vyhodnocen jako pozitivní, zbylých 40 vzorků bylo vyhodnoceno jako negativní.

Počet kopií patogenu *K. pneumoniae*:

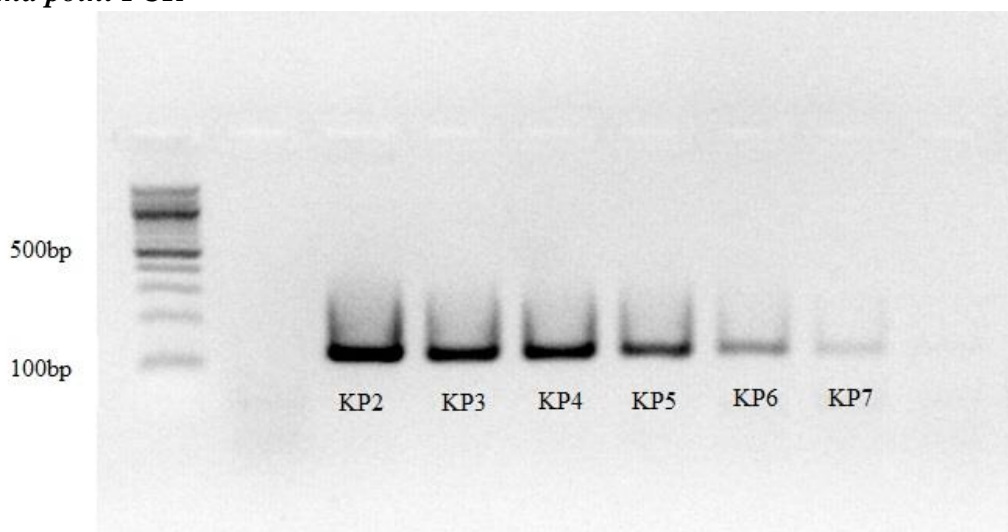
$$\frac{\text{množství kopií DNA [ng]} * 6,022 * 10^{23}}{\text{délka templátové DNA [bp]} * 1 * 10^9 * 660} = \text{počet kopií}$$

$$\frac{0,00307 * 6,022 * 10^{23}}{60 * 1 * 10^9 * 660} = \text{počet kopií}$$

$$\text{počet kopií} = 4,67 * 10^8$$

Ve vzorku bylo $4,67 * 10^8$ kopií patogenu *K. pneumoniae*.

6.3 End point PCR



Obrázek 1: Zobrazení ředící řady izolátu DNA *K. pneumoniae* pomocí elektroforézy. Počet kopií DNA v jednotlivých ředěních: KP2 = 30,7 ng/μl; KP3 = 3,07 ng/μl; KP4 = 0,307 ng/μl; KP5 = 0,0307 ng/μl; KP6 = 0,00307 ng/μl; KP7 = 0,000307 ng/μl

Detekční limit byl stanoven v desítkovém ředění jako 0,000307 ng/μl (ředění KP7), délka produktu byla 142 bp. Metoda byla specifická pro danou sekvenci DNA. Verifikovaný vzorek nebyl viditelný (data nejsou zobrazena).

6.4 Porovnání metod

	End point PCR	SYBR Green	TaqMan
Specificita	+	+	+
Účinnost		100%	95%
LOD	0,000307 ng/μl	0,0000307 ng/μl	0,000307 ng/μl
Verifikace	-	-	+

Tabulka 5: Porovnání metod end point PCR, real-time SYBR Green PCR a real-time TaqMan PCR.

Účinnost reakce pro SYBR Green real-time PCR byla stanovena na 100 %, pro TaqMan real-time PCR na 95 %.

Detekční limit pro end point PCR byl stanoven v desítkovém ředění jako 0,000307 ng/μl, pro SYBR Green 0,0000307 ng/μl za překročení prahu detekce ve 34. cyklu a pro TaqMan 0,000307 ng/μl za překročení prahu detekce ve 34. cyklu.

Verifikační vzorek 1508 byl vyhodnocen jako pozitivní pouze u TaqMan real-time PCR, zbylých 40 vzorků bylo vyhodnoceno jako negativní u obou metod real-time PCR.

7 Diskuze

Z hlediska klinického významu je bakterie *K. pneumoniae* nejvýznamnějším zástupcem rodu *Klebsiella* (Jasim, nedatováno). Pro zahájení léčby je nutná včasná detekce této bakterie a její spolehlivé odlišení od příbuzných druhů, jako např. *K. oxytoca*, která je druhým nejrozšířenějším druhem bakterií rodu *Klebsiella*, hned po *K. pneumoniae* (Kovtunovych et al., 2003).

Při porovnání s end-point PCR jsou metody PCR v reálném čase rychlejší a zajišťují specifitu za použití sond a barviv vázajících DNA (Hartman et al., 2009) a zároveň zaznamenávají množství amplifikované DNA v každém cyklu (v reálném čase) (Bustin, 2005). Lze tak kombinovat amplifikaci DNA a detekci amplifikačních produktů bez potřeby gelové elektroforézy (Bustin, 2000).

Pro tuto práci byly použity primery navržené v programu Primer Premier 5 pro gen *PhoE* bakterie *K. pneumoniae* (Sun et al., 2010) pro end-point PCR a SYBR Green real-time PCR. Pro TaqMan real-time PCR byly použity primery navržené v programu Primer ExpressTM pro gen *PhoE* bakterie *K. pneumoniae* (Stehlíková, nepublikováno).

Zdařilých výsledků za použití uvedených primerů, se podařilo dosáhnout za vyšší teploty fáze annealingu 57 °C než uvedených 55 °C v publikaci Sun et al. (2010).

Pro začátek praktické části této práce byl izolát DNA *K. pneumoniae* rozředěn desítkovým ředěním a bylo provedeno měření jednotlivými modifikacemi PCR, čímž byly získány amplifikační křivky jednotlivých ředění a stanoven detekční limit pro každou metodu.

Detekční limit pro end-point PCR byl stanoven v desítkovém ředění jako 0,000307 ng/μl, pro SYBR Green 0,000307 ng/μl za překročení prahu detekce ve 34. cyklu a pro TaqMan 0,000307 ng/μl za překročení prahu detekce ve 34. cyklu.

TaqMan real-time PCR byla použita pro detekci *K. pneumoniae* v publikaci Hartman et al., 2009 za využití odlišných primerů a vyšších teplot nasedání primeru (60 °C). Detekční limit pro tuto reakci byl stanoven jako 0,000050 ng/μl, citlivost reakce byla nižší než citlivost dosažená v této bakalářské práci.

Účinnost reakce pro SYBR Green real-time PCR byla vypočtena na 100 %, pro TaqMan real-time PCR na 95 %, což může být dáno méně vhodnou sekvencí primerů. V publikaci Sun et al., 2010, účinnost reakce pro SYBR Green real-time PCR za použití stejných primerů a nižší teploty nasedání primerů (55 °C) oproti teplotě použité v této

bakalářské práci (57 °C) odpovídala 101 %. Účinnost reakce v publikaci Hartman et al., 2009, byla stanovena na 94 %.

Variace izolátů bakteriální DNA byla v kombinaci se zmíněnými primery testována metodami SYBR Green a TaqMan real-time PCR. K amplifikaci cílové DNA došlo pouze u izolátu *K. pneumoniae* 4799 ze sbírky DSMZ, čímž byla potvrzena specifita použitých primerů.

SYBR Green real-time PCR pro detekci bakterie *K. pneumoniae* byla popsána také v publikaci Sun et al., 2010. V tomto výzkumu byly použity stejné primery pro SYBR Green real-time PCR. Teplota nasedání primerů byla oproti teplotě použité pro tuto práci (57 °C) nižší, 55 °C. Specifita použitých primerů byla testována na 17 bakteriálních kulturách. K amplifikaci cílové DNA došlo pouze u izolátu *K. pneumoniae*, čímž byla potvrzena specifita použitých primerů.

Detekce bakterie *K. pneumoniae* byla optimalizována také v publikaci Liu et al., 2008. Byly použity odlišné primery avšak teplota nasedání byla totožná s teplotou použitou v této bakalářské práci. Primery byly testovány na 79 bakteriálních kmenech a jejich specifita byla potvrzena. V této bakalářské práci byly primery pro end point totožné s primery pro SYBR Green real-time PCR a v obou případech byla potvrzena specifita reakce.

V publikaci Kurupati et al., 2004, za použití odlišných primerů a sondy a při stejných teplotách reakce bylo testováno 13 bakteriálních izolátů DNA. Specifita v této bakalářské práci byla provedena na dvojnásobném množství izolátů bakteriální DNA. V obou případech došlo k amplifikaci cílové DNA pouze u izolátu *K. pneumoniae*, čímž bylo prokázáno, že cílová DNA je specifická pro *K. pneumoniae*.

V publikaci Turton et al., 2008, byla pro detekci *K. pneumoniae* použita metoda Multiplex PCR s vizualizací výsledku pomocí elektroforézy. Primery byly specifické a metoda byla vyhodnocena jako rychlá a spolehlivá. Výhodou této metody je možnost amplifikovat několik různých sekvencí DNA současně, čímž se snižuje časová náročnost i náročnost na provedení.

Následná verifikace metody byla provedena na 41 vzorcích stěrů z bukalní sliznice. Pouze v případě vzorku 1508 došlo k amplifikaci cílové DNA. Práh detekce v případě SYBR Green real-time PCR byl překročen za detekčním limitem, tudíž byl vzorek vyhodnocen jako negativní. V případě TaqMan real-time PCR byl práh detekce překročen před detekčním limitem a vzorek byl vyhodnocen jako pozitivní.

Verifikace na 52 vzorcích byla provedena v publikaci Kurupati et al., 2004. s využitím odlišných primerů a sondy, avšak za stejných teplotních podmínek, stanovili detekční limit 0,000010 ng/μl za překročení prahu detekce ve 27. cyklu. Bylo tak dosaženo vyšší citlivosti reakce oproti citlivosti stanovené v této bakalářské práci. 48 vzorků bylo vyhodnoceno jako negativní, 4 vzorky byly testovány pozitivně za překročení prahu detekce ve 20. cyklu reakce. Nebyl detekován žádný falešně pozitivní signál.

Na základě verifikace metod, kdy byla cílová DNA amplifikována pouze u vzorku 1508 s vyhodnocením positivity u metody TaqMan real-time PCR, byla metoda TaqMan real-time PCR stanovena jako citlivější.

Výsledky měření metodou SYBR Green real-time PCR vypovídají o specifické a citlivé detekci bakterie *K. pneumoniae*, čímž odpovídá výsledkům v publikaci Sun et al. (2010).

8 Závěr

V této bakalářské práci se podařilo optimalizovat podmínky reakcí pro detekci bakterie *K. pneumoniae* prostřednictvím metod SYBR Green real-time PCR a TaqMan real-time PCR. Bakterie bylo možné spolehlivě detekovat za použití vybraných primerů a sondy a za stanovených podmínek. Reakce byly vyhodnoceny jako citlivé a vysoce specifické. Optimalizované metody real-time PCR je možné využít pro detekci bakterie *K. pneumoniae*. Detekce bude specifická pro danou bakterii.

Seznam literatury

1. Abd-El Salam, 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.
2. Ares, M., 2012. Bacterial RNA isolation. *Cold Spring Harbor protocols*. 2012(9), 1024-7. doi: 10.1101/pdb.prot071068.
3. Ashurst, J. V., Dawson, A., 2022. *Klebsiella pneumoniae* [online]. StatPearls [cit. 2022-03-12].
Dostupné z: <https://www.statpearls.com/articlelibrary/viewarticle/23903/>
4. Bell, J., 1989. The polymerase chain reaction. *Immunology today*. 10(10), 351–5. doi: 10.1016/0167-5699(89)90193-X.
5. Bengoecha, J. A., Pessoa, J., 2019. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. Federation of European Microbiological Societies *Microbiology Reviews*. 43(2), 123–44. doi: 10.1093/femsre/fuy043.
6. Beránek, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum. 196 s. ISBN 978-80-246-3224-7.
7. Bustin, S. A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 25(2), 169–13. doi: 10.1677/jme.0.0250169.
8. Bustin, S. A., 2005. Real-time PCR. *Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics*. 10(1), 117–1. doi: 10.1081/E-EDGP 120020684.
9. Cabelli, V. J., Pickett, M. J., 1953. The significance of lactose fermentation and its relationship to resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. 66(4), 443–7. doi: 10.1128/jb.66.4.443-447.1953.
10. CABI digital library, 2021. *Klebsiella pneumoniae* [online databáze]. *CABI digital library* [cit. 2023-03-10]. doi: 10.1079/cabicompndium.78663.
11. Chen, I. R., Lin, S. N., Wu, X. N., Chou, S. H., Wang, F. D., Lin, Y. T., 2022. Clinical and Microbiological Characteristics of Bacteremic Pneumonia Caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol. Frontiers in cellular and infection microbiology*. 12, 903682. doi: 10.3389/fcimb.2022.903682.
12. Clegg, S., Murphy, C. N., 2016. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology spectrum*. 4(1). doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012.

13. Désiré, N., Dehée, A., Schneider, V., Jacomet, C., Goujon, C., Girard, P. M., Rozenbaum, W., Nicolas, J. C., 2001. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 39(4), 1303–10. doi: 10.1128/JCM.39.4.1303-1310.2001.
14. Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A., Brisse, S., 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of clinical microbiology*. 43(8), 4178–82. doi: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005.
15. Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J., Dveksler, G.S., 1993. General concepts for PCR primer design. In: PCR Methods and Applications. *Cold Spring Harbor Laboratory*. 3(3), 30–7. doi: 10.1101/gr.3.3.s30.
16. 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), 363–70. doi: 10.1007/s40995-017-0173-5.
17. Figueroa-Bossi, N., Balbontín, R., Bossi, L., 2022. Preparing Plasmid DNA from Bacteria. *Cold Spring Harbor protocols*. 2022(10). doi: 10.1101/pdb.prot107852.
18. Fukigai, S., Alba, J., Kimura, S., Iida, T., Nishikura, N., Ishii, Y., Yamaguchi, K., 2007. Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. *International journal of antimicrobial agents*. 29(3),306 – 10. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.10.011.
19. Garibyan, L., a Avashia, N., 2013. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 133(3), 1–4. doi: 10.1038/jid.2013.1.
20. 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): e0163148. doi: 10.1371/journal.pone.0163148.
21. Hartman, L. J., Selby, E. B., Whitehouse, C. A., Coyne, S. R., Jaissle, J. G., Twenhafel, N. A., Burke R. L., Kulesh, D. A., 2009. Rapid real-time PCR assays for detection of *Klebsiella pneumoniae* with the *rmpA* or *magA* genes associated with the hypermucoviscosity phenotype: screening of nonhuman primates. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 11(5), 464–471. doi: 10.2353/jmoldx.2009.080136
22. Jamshaid, M., Shahzad, A., Munir, H., Tayyab, M., Zafar, A. A., Kamal, I., 2021. Invasive *Klebsiella Pneumoniae* Syndrome in Qatar. *Authorea Preprints*. 13(5), e15015. doi: 10.7759/cureus.15015.

23. Jasim, S. A. (nedatováno). *Klebsiella* spp. In: Group of Iraqi Academics. *Pathogenic Bacteria: Virulence and Diseases*. 76–93. ISBN: 978-1-956949-03-2.
24. Jia, Y. (2012). Real-time PCR. *Methods in cell biology*. 112 (55-68). doi: 10.1016/B978-0-12-405914-6.00003-2.
25. Jondle, C. N., Gupta, K., Mishra, B. B., Sharma, J., 2018. *Klebsiella pneumoniae* infection of murine neutrophils impairs their efferocytic clearance by modulating cell death machinery. *Public Library of Science*. 14(10), e1007338. doi: 10.1371/journal.ppat.1007338.
26. Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology – New Interdisciplinary Science*. 147–163. ISBN 978-1-78985-090-2.
27. Kovtunovych, G., Lytvynenko, T., Negrutka, V., Lar, O., Brisse, S., Kozyrovska, N., 2003. Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pehX* gene. *Research in microbiology*. 154(8), 587–92. doi: 10.1016/S0923-2508(03)00148-7
28. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*. 27(2-3), 95–125. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
29. Kurupati, P., Chow, C., Kumarasinghe, G., Poh, C. L., 2004. Rapid Detection of *Klebsiella pneumoniae* from Blood Culture Bottles by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(3), 1337-40. doi: 10.1128/JCM.42.3.1337-1340.2004.
30. Lam, M. M. C., Wick, R. R., Watts, S. C., Cerdeira, L. T., Wyres, K. L., Holt, K. E., 2021. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nature communications*. 12, 4188. doi: 10.1038/s41467-021-24448-3.
31. Lawlor, M. S., Hsu, J., Rick, P. D., Miller, V. L., 2005. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Molecular microbiology*. 58(4), 1054-1073. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04918.x.
32. Liu, Y., Liu, C., Zheng, W., Zhang, X., Yu, J., Gao, Q., Hou, Y., Huang, X., 2008. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S–23S internal transcribed spacer. *International journal of food microbiology*. 125(3), 230–5. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.005.

33. 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), e3923. doi: 10.3791/3923.
34. Ma, H., & Shieh, K. J., 2006. ELISA technique. *Nature and science*. 4(2), 36-37. ISSN: 1545-0740.
35. Maiden, M. C., 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 60, 561–88. doi: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121325.
36. Martin, R. M., Bachman, M. A., 2018. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 8(4). doi: 10.3389/fcimb.2018.00004.
37. Mori, M., Ohta, M., Agata, N., Kido, N., Arakawa, Y., Ito, H., Komatsu, T., Kato, N., 1989. Identification of species and capsular types of *Klebsiella* clinical isolates, with special reference to *Klebsiella planticola*. *Microbiology and immunology*. 33(11), 887–95. doi: 10.1111/j.1348-0421.1989.tb00976.x.
38. Moradigaravand, D., Martin, V., Peacock, S. J., Parkhill, J., 2017. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *American Society for Microbiology*. 8(1): e01976-16. doi: 10.1128/mBio.01976-16.
39. Mullis, K. B., 1994. The Polymerase Chain Reaction (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(12), 1209–13. doi:10.1002/anie.199412091
40. Murdoch, D. R., 2004. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 112(11–12), 713 – 27. doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1202.x.
41. Murdoch, D. R., O'Brien, K. L., Scott, J. A., Karron, R. A., Bhat, N., Driscoll, A. J., Knoll, M. D., & Levine, O. S., 2009. Breathing new life into pneumonia diagnostics. *Journal of clinical microbiology*. 47(11), 3405–8. doi: 10.1128/JCM.01685-09.
42. 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.

43. Podschun, R., and Ullmann, U., 1998. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*. 11(4), 589–603. doi: 10.1128/CMR.11.4.589.
44. Prince, S. E., Dominger, K. A., Cunha, B. A., Klein, N. C., 1997. *Klebsiella pneumoniae pneumonia*. *Heart & lung*. 26(5), 413–7. doi: 10.1016/s0147-9563(97)90028-5.
45. 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.
46. *Real-time PCR*, ©2014-2019. [online]. Labguide: průvodce laboratoří [cit. 2022.09.04]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>
47. Rutledge, R. G., Cote, C., 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic acids research*. 31(16), e93. Doi: 10.1093/nar/gng093.
48. Sharma, S. K., Mudgal, N. K., Sharma, P., & Shrngi, B. N., 2015. Comparison of phenotypic characteristics and virulence traits of *Klebsiella pneumoniae* obtained from pneumonic and healthy camels (*Camelus dromedarius*). *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 3(2), 116–22. doi: 10.14737/journal.aavs/2015/3.2.116.122.
49. Soto, E., Marchi, S., Beierschmitt, A., Kearney, M., Francis, S., VanNess, K., Vandenplas, M., Thrall, M., Palmour, R., 2016. Interaction of non-human primate complement and antibodies with hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*. *Veterinary Research*. 47(40), 1–13. doi: 10.1186/s13567-016-0325-1.
50. Starzyk-Łuszcz, K., Zielonka, T. M., Jakubik, J., Życińska, K., 2017. Mortality Due to Nosocomial Infection with *Klebsiella pneumoniae* ESBL⁺. *Advances in experimental medicine and biology*. 1022, 19-26. Doi: 10.1007/5584_2017_38.
51. Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova Univerzita. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7
52. 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.

53. Tan, S. C., Yiap, B. C., 2009. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of biomedicine and biotechnology*. 2009, 574398. doi: 10.1155/2009/574398.
54. Turton, J. F., Baklan, H., Siu, L. K., Kaufmann, M. E., Pitt, T. L., 2008. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella sp.* and comparison of isolates within these serotypes. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 284(2), 247–52. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01208.x.
55. Turton, J. F., Perry, C., Elgohari, S., Hampton, C. V., 2010. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *Journal of medical microbiology*, 59(5), 541–7. doi: 10.1099/jmm.0.015198-0.
56. 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.
57. Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., Wang, H., 2020. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of environmental research and public health*. 17(17), 6278. doi: 10.3390/ijerph17176278.
58. Weier, H. U., Gray, J. W., 1988. A programmable system to perform the polymerase chain reaction. *Dna*. 7(6):441–7. doi: 10.1089/dna.1.1988.7.441
59. Wu, D.Y.W., Ugozzoli, B.K., Pal, J., Qian, and Wallace, R.B., 1991. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biology*. 10(3), 233–8. doi: 10.1089/dna.1991.10.233.
60. Wyres, K. L., Holt, K. E., 2016. *Klebsiella pneumoniae* population genomics and antimicrobial-resistant clones. *Trends in microbiology*. 24(12), 944–56. doi: 10.1016/j.tim.2016.09.007.
61. Young, N., Thomas, M., 2018. Meningitis in adults: diagnosis and management. *Internal medicine journal*. 48(11), 1294–307. doi: 10.1111/imj.14102.
62. Zahradníček, Ondřej. Repetitorium podzimního semestru– diagnostika jednotlivých skupin mikrobů. [Dokument] Brno: Masarykova univerzita, 2012. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/podzim2013/VLLM0522c/um/35388112/Zahradnickovo_podzimni_repetitorium.pdf.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Zobrazení ředící řady izolátu DNA *K. pneumoniae* pomocí elektroforézy . 34

Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam bakteriálních kmenů ze sbírky DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).....	22
Tabulka 2: Reakční cyklus SYBR Green real-time PCR.	24
Tabulka 3: Reakční cyklus TaqMan real-time PCR.	25
Tabulka 4: Reakční cyklus end point PCR.	27
Tabulka 5: Porovnání metod end point PCR, real time SYBR Green PCR a real time TaqMan PCR.	35

Seznam grafů

Graf 1: Amplifikační křivky ředící řady izolátu DNA bakterie <i>K. pneumoniae</i>	29
Graf 2: Standardní křivka ředící řady izolátu DNA <i>K. pneumoniae</i> pro SYBR Green real-time PCR.....	30
Graf 3: Melting curve (křivka tání).....	31
Graf 4: Amplifikační křivky ředící řady izolátu DNA bakterie <i>K. pneumoniae</i>	32
Graf 5: Standardní křivka ředící řady izolátu DNA <i>K. pneumoniae</i> pro TaqMan real-time PCR.....	33

Seznam zkratek

CRE – *carbapenem resistant enterobacteriaceae*, karbapenem rezistentní *enterobacteriaceae*

Ct – *cycle threshold*, prahová hodnota cyklu

DEPC – *deionized, diethylpyrocarbonate treated*, deionizovaná, diethylpyrokarbonátem ošetřená

DNA – *deoxyribonucleic acid*, deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – *double stranded DNA*, dvouvláknová DNA

DSMZ – *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ethylendiamintetraoctová kyselina

ELISA – *enzyme-linked immuno sorbent assay*, Enzymová imunoanalýza s enzymem vázaným na imunosorbent

ESBL – *Extended spectrum β -lactamases*, širokospektré betalaktamázy

HMV – *hypermucoviscosity*, hypermukoviskozita

LED – *Light-Emitting Diode*, světlo emitující dioda

MLST – *Multilocus sequence typing*, multilokusová sekvenační typizace

NK – nukleová kyselina

PCR – *polymerase chain reaction*, polymerázová řetězová reakce

PhoE – *phosphoporin PhoE*, gen kódující poriny

RNA – *ribonucleic acid*, ribonukleová kyselina

ssDNA – *single stranded DNA*, jednovláknová DNA

Taq – *Thermus aquaticus*, DNA polymeráza izolovaná z termofilní bakterie

TBE – *tris borate EDTA*

Tm – *melting temperature*, teplota tání primeru

UV – *ultraviolet light*, ultrafialové záření