



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Detekce antimikrobiální rezistence u původců sexuálně přenosných infekcí

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Autor: Pavlína Krejčíková

Vedoucí práce: Mgr. Marcela Krůtová, Ph.D.

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Detekce antimikrobiální rezistence u původců sexuálně přenosných infekcí 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 2. 5. 2023

podpis

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala mé školitelce Mgr. Marcele Krůtové, Ph.D. za její odborné vedení, trpělivost, čas a cenné rady, díky kterým jsem mohla práci vypracovat. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu pracovníků z Ústavu lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol za jejich ochotu, jmenovitě Mgr. Báře Dratvové. V neposlední řadě děkuji celé své rodině za všestrannou podporu nejen během studia.

Tato práce vznikla za podpory projektu Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103), financovaného Evropskou unií – Next Generation EU.

Detekce antimikrobiální rezistence u původců sexuálně přenosných infekcí

Abstrakt

Sexuálně přenosné infekce (STD) představují riziko pro veřejné zdraví, a to zejména z hlediska nárůstu antibiotické rezistence. V předkládané práci jsou shrnuty poznatky o nejčastějších původcích těchto infekcí, laboratorní diagnostice a současné epidemiologii, antimikrobiální rezistenci a jejích molekulárních mechanismech. Stanovení antimikrobiální citlivosti u většiny původců STD není v rutinní mikrobiologii možné z hlediska vysokých nebo specializovaných kultivačních nároků. Také, v současné době, z důvodu vyšší citlivosti detekce, jsou k diagnostice STD využívány metody molekulární biologie, které upozaďují provádění kultivace u *Neisserie gonorrhoeae*.

Experimentální část projektu si kladla za cíl detekci popsáných mechanismů rezistence v pozitivních vzorcích na přítomnost původců STD vyšetřených pomocí multiplexové PCR. V prvním kroku bylo použito celogenomové sekvenování (WGS). Bohužel, získané sekvence obsahovaly velké množství humánních sekvencí a extrahumánní sekvence tak neposkytovaly dostatečné pokrytí pro detekci jednotlivých genů a mutací. Nedostatečné pokrytí bylo zjištěno i po odstranění části humánní DNA ze vzorku pomocí saponinu a tritonu-X. Vzhledem k nevhodnosti WGS jsme optimalizovali a zavedli dříve popsané metody cílově specifické molekulární detekce nejčastějších mechanismů rezistence u *N. gonorrhoeae*. První metodou je PCR amplifikace s analýzou křivek tání (HRM). Jako referenční metodu k HRM jsme použili Sangerovo sekvenování šesti genů (*penA*, *mtrR*, *ponA*, *porB*, *23S rRNA*, *gyrA*).

V průběhu řešení práce byly optimalizovány teplotní profily pro PCR amplifikaci jednotlivých genů. Pro úplné pokrytí sekvenovaného úseku DNA (genu) dále bylo nutné navrhnout doplňující sekvenační primery. Pro klinické použití HRM pro detekci mechanismů rezistence u *N. gonorrhoeae* je nutné metodu ověřit na vzorcích DNA s identifikovanými mechanismy rezistence pomocí sekvenování jednotlivých fragmentů, které bylo v předložené práci optimalizováno.

Klíčová slova

Antibiotika, bakterie, rezistence, sexuálně přenosné infekce, PCR

Detection of antimicrobial resistance in pathogens of sexually transmitted infections

Abstract

Sexually transmitted diseases (STDs) pose a public health risk, especially in terms of the rise of antibiotic resistance. This thesis summarizes the knowledge on these infections, most common causative agents, laboratory diagnosis and current epidemiology, antimicrobial resistance and its molecular mechanisms. Determination of antimicrobial susceptibility in most STD pathogens is not possible in routine microbiology due to high or specialized culture requirements. Also, because of the higher sensitivity of detection, molecular biology methods are used to diagnose STDs, which negates the need to perform culture in *Neisseria gonorrhoeae*.

The experimental part of the project aimed to detect the described resistance mechanisms in positive samples tested by multiplex PCR for the presence of STD agents. In the first part, we used whole genome sequencing (WGS). Unfortunately, the sequences obtained contained a large number of human sequences and thus the extra-human sequences did not provide sufficient coverage. The same result was achieved after a sample pretreatment with saponin and Triton-X followed by purification. Due to the unsuitability of WGS, we attempted to optimize and implement previously described target-specific methods to detect the most common resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae*. The first method was PCR amplification with melting curve analysis (HRM). As a reference method to HRM, we used Sanger sequencing of six genes (*penA*, *mtrR*, *ponA*, *porB*, *23S rRNA*, *gyrA*).

During this work, we optimized the temperature profiles for PCR amplification of individual genes. To cover the analyzed DNA fragment (part of the gene) it was necessary to design additional sequencing primers. The clinical use of HRM for the detection of resistance mechanisms in *N. gonorrhoeae* needs to be validated on DNA samples with identified resistance mechanisms by specific fragment sequencing, which was optimized in the present work.

Keywords

Antibiotics, bacteria, resistance, sexually transmitted infections, PCR

Obsah

Úvod.....	8
2 Teoretická část.....	9
2.1 Problematika sexuálně přenosných onemocnění	9
2.2 Patogenní původci.....	10
2.2.1 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	11
2.2.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>	16
2.2.3 <i>Mycoplasma genitalium</i>	17
2.2.4 <i>Mycoplasma hominis</i>	19
2.2.5 <i>Trichomonas vaginalis</i>	20
2.2.6 <i>Ureaplasma urelyticum</i> a <i>Ureaplasma parvum</i>	21
3 Antimikrobiální rezistence	22
3.1 Primární druh rezistence	23
3.2 Sekundární druh rezistence	23
3.3 Multirezistentní kmeny	24
4 Molekulární diagnostika sexuálně přenosných infekcí	24
4.1 Real-time PCR	25
5 Komerčně dostupné kity.....	26
5.1 AusDiagnostic	26
5.2 GeneProof	27
5.3 EliGene.....	28
6 Cíle práce a hypotézy	29
6.1 Předkládaná práce má dva stěžejní cíle:.....	29
6.2 Hypotézy:	29
7 Metodika.....	30
7.1 Materiál	30
7.1.1 Pacientské vzorky	30
7.1.2 Primery pro PCR.....	30
7.1.3 Primery pro PCR s HRM.....	31
7.1.4 Chemikálie a kity	32
7.2 Metody	32
7.2.1 Izolace bakteriální DNA	32
7.2.2 Celogenomové sekvenování (WGS).....	33
7.2.3 Úprava vzorků na WGS – odstranění humánní DNA.....	34
7.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)- obecný princip	35

7.3.1	PCR s analýzou křivky tání (HRM).....	35
7.3.2	PCR amplifikace jednotlivých genů <i>N. gonorrhoeae</i> pro Sangerovo sekvenování	36
7.3.3	Kontrola PCR amplifikonů pomocí gelové elektroforézy	37
7.3.4	Přečištění PCR produktů pro sekvenační reakci.....	38
7.4	Sangerovo sekvenování – obecný princip.....	39
7.4.1	Sekvenační reakce.....	39
7.4.2	Přečištění po sekvenační reakci	40
7.4.3	Sangerovo sekvenování	41
8	Výsledky.....	42
8.1	Celogenomové sekvenování.....	42
8.2	PCR s HRM analýzou	42
8.3	Cílově specifická PCR pro následné sekvenování	44
9	Diskuze	46
10	Závěr	49
11	Seznam literatury	50
12	Seznam tabulek	59
13	Seznam obrázků.....	60
14	Seznam příloh	61
15	Seznam zkratk	62

Úvod

Sexuálně přenosné choroby jsou jedním z hlavních problémů veřejného zdraví, které představují vážné zdravotní problémy pro nakaženého jedince. Kontrola sexuálně přenosných onemocnění představuje jeden ze zásadních cílů Světové zdravotnické organizace (WHO) vzhledem k narůstající incidenci těchto infekcí. V mnoha zemích byly zavedeny preventivní programy, založené na podpoře zodpovědného sexuálního chování, včasné diagnostiky a adekvátní léčby. Značné šíření sexuálně přenosných infekcí je podpořeno tzv. sexuální turistikou.

Antimikrobiální rezistence je problémem nejen v oblasti sexuálně přenosných chorob. Jedná se o schopnost mikrobů, pozměnit své vlastnosti tak, že na ně účinné antimikrobiální látky (například antibiotika) přestávají působit. Vznik rezistence, probíhá u různých bakteriálních druhů různými mechanismy. Některé z těchto mechanismů jsou přenositelné mezi bakteriálními druhy. Riziko rezistence představuje i nadužívání antibiotik. Jedná se o celosvětový zdravotnický problém, proto je dané téma v dnešní době velmi aktuální.

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na diagnostiku antimikrobiální rezistence *Neisseria gonorrhoea* přítomné ve vzorcích pacientů. *N.gonorrhoea* je obtížně kultivovatelná bakterie, proto může být stanovení antimikrobiální citlivosti rutinně komplikované. Vzhledem k vyšší citlivosti detekce jsou nyní pro detekci STD obecně používány molekulární metody, které kultivaci obcházejí. V prvním kroku této práce bylo použito celogenomové sekvenování (WGS), jakožto metody vhodné pro analýzu genetických změn přítomných v jednotlivých genech. Bohužel získané sekvence vykazovaly silnou přítomnost humánní DNA, a to i po úpravě vzorku, která měla vést k odstranění této humánní DNA. Z důvodu nevhodnosti použití WGS byla metoda PCR amplifikace s analýzou křivek tání (HRM) a Sangerovým sekvenováním jako referenční metodou. Bylo nutné optimalizovat teplotní profily pro amplifikaci jednotlivých genů a navrhnout další primery pro úplné pokrytí analyzovaného genu. Dále byla v rámci práce provedena přehledná rešerše problematiky patogenních organismů způsobujících STD a jejich možných antimikrobiálních rezistencí, součástí je i přehled principů běžně používaných diagnostických metod.

2 Teoretická část

2.1 *Problematika sexuálně přenosných onemocnění*

Pohlavní nákazy se u nás i ve světě vyskytovaly již od útlé historie, avšak začátkem 90. let 20. století došlo k strmému nárůstu jejich incidence (Poláčková, 2008). Souhrnný název těchto onemocnění značíme zkratkou STD, z anglického názvu „Sexually Transmitted Diseases“

Jak je již z názvu patrné, druhy těchto chorob se šíří pohlavním stykem (Poláčková, 2016). Podle odhadů Světové zdravotnické organizace (WHO), se denně ve světě nakazí 1 milion nových pacientů a ročně je evidováno více než 376 milionů nových případů STD. Různé situace v zemích, jak ekonomické, sociální či politické, často odrážejí počty nakažených a nemocných. Pro STD je přirozeným hostitelem v přírodě především člověk a jejich diagnostika vychází nejčastěji z příznaků lokalizovaných na genitáliích, méně často na jiných částech těla pacienta (Rozsypal, 2015). Jejich následná léčba je směřována na dermatovenerologii. Včasné odhalení nemoci je důležité pro zlepšení procesu onemocnění jak u pacienta, tak i nově diagnostikovaného sexuálního partnera (Poláčková, 2016).

Česká republika se řadí mezi země, ve kterých je povinnost hlásit výskyt vybraných STD (Poláčková, 2016). Informuje nás o tom řada zákonů a vyhlášek. Povinnost hlášení podléhá zákonu č. 372/2011 Sb. ze dne 6. 11. 2011, platný od 1. 4. 2012, jedná se o zákon poskytování zdravotních služeb a dále Vyhláška č. 195/2005 Sb. o předcházení a šíření infekčních nemocí a její příloha č. 2 – povinného léčení (Sbírka zákonů České republiky: Zákon č. 327/2011 Sb.; 4730–4801). Registr pohlavních nemocí a následné počty nakažených zaznamenává Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Registr v roce 2019 evidoval 2 530 hlášení. U gonokokových infekcí byl zaznamenán nárůst z 1 429 případů za rok 2018 na 1 636 případů v roce 2019 (ÚZIS, 2019). Český statistický úřad dále zaznamenal nárůst gonokokových infekcí z 1 636 případů v roce 2019 na 1 667 případů za rok 2020 (CSU, 2020).

Vysoká incidence STD souvisí s několika jevy vyskytujícími se poslední dobou ve společnosti. Zvýšená migrace obyvatelstva, uvolňování sexuálních zábran, změna životního stylu. Novodobý problém představuje i tzv. sexuální turistika. Tento druh turistiky můžeme definovat jako plánovanou cestu do cizích zemí, za účelem sexu.

Avšak, právě globalizace a mezinárodní cestování, nejvíce přispívají k šíření sexuálně přenosných patogenů (Frost et al., 2019). Lidé cestující za tzv. sexuální turistikou cíleně, tím samozřejmě hovoříme i o českých občanech, kteří mohou následně choroby sexuálního charakteru zanechat mimo jiné i do České republiky (Poláčková, 2008).

Studie odhadují, že až jedna třetina mezinárodních cestovatelů provozuje příležitostný sex v zahraničí a až polovina uvádí nekonzistentní užívání prezervativů. Další studie hodnotily rizikové faktory u cestovatelů, u kterých je pravděpodobnější, že provozují pohlavní styk bez prezervativu, a proto jsou vystaveni většímu riziku získání STD (Svensson et al., 2018). Riziko získání STD představují i následující faktory: delší doba cestování, absence prezervativů při cestě do zahraničí, cestování do regionu s nízkými příjmy, nedostatek rad před cestou, užívání alkoholu a drog, mužské pohlaví a vyšší počet sexuálních partnerů. Nadále pak nedostatečná informovanost o ochraně a nižší věk jedince, předchozí sex bez prezervativu s příležitostnými partnery, pohlavní styk s komerčními prostitutkami a předchozí anamnéza STD (Crawford et al., 2016).

Při podezření přítomnosti STD u pacienta je nutností vyšetření sexuálních partnerů a následné zahájení léčby, na základě klinického obrazu a laboratorního vyšetření. Důkladnost provedeného vyšetření předchází k nerozpoznání příznaků a vzniku rezistence vyvolanou nejčastěji antibiotickou léčbou (Poláčková, 2016).

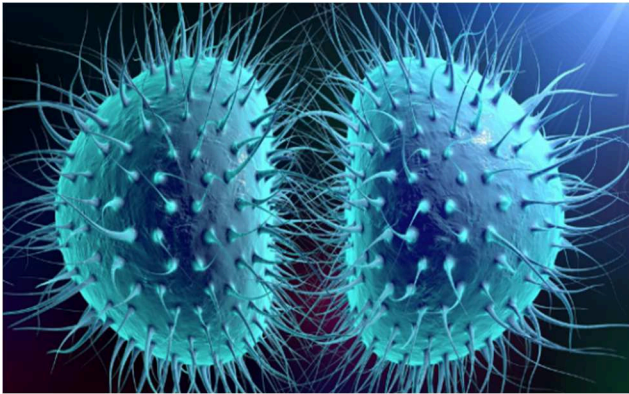
2.2 Patogenní původci

STD tvoří širokou škálu onemocnění, kterou způsobují různé mikroorganismy s různými bakteriálními vlastnostmi. Důležitou vlastností bakteriální buňky je její patogenita. Jedná se o schopnost mikroorganismů vniknout do těla a za pomoci množení způsobit onemocnění. U různých hostitelů se patogenita bakteriálních buněk liší. Proto lze mikroorganismy rozdělit na **nepatogenní, podmíněně patogenní a patogenní** (Drnková, 2019).

Podmíněně patogenní neboli oportunní patogeny vyvolávají infekční metabolizmus u oslabených osob (Schindler, 2014). Typicky se oportunní patogeny uplatní u hostitele s oslabeným imunitním systémem z důvodu již probíhající jiné nemoci. Patogenní bakterie vyvolávají onemocnění vždy a za jakýchkoliv okolností (Drnková, 2019).

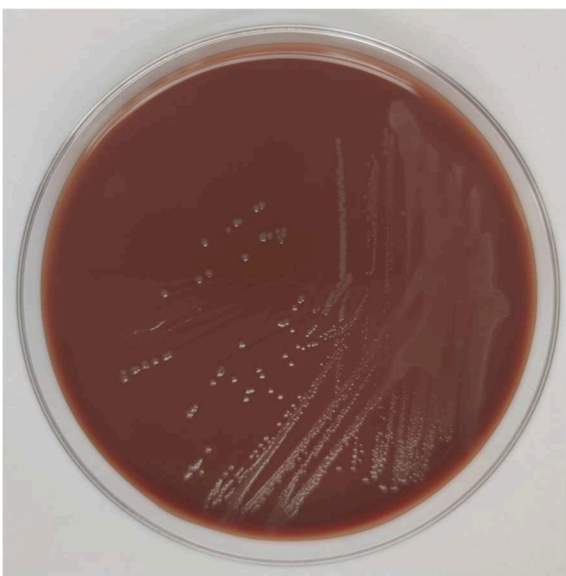
2.2.1 *Neisseria gonorrhoeae*

Jedním z mikrobů nejčastěji způsobujících STD je právě *Neisseria gonorrhoeae*. Tato obligátní patogenní bakterie se vyskytuje ve formě gramnegativních aerobních diplokoků, které jsou k sobě přitocené delší stranou a připomínají tak tvar kávového zrna (Schindler, 2014).



Obrázek 1: *Neisseria gonorrhoeae* (GeneProof, 2022)

Faktorem virulence pro tuto bakterii jsou, pili (povrchová vlákna), díky kterým je schopna k adhezi na sliznici urogenitálního traktu (Žemličková, 2019). *N. gonorrhoeae* je velmi citlivá k zevnímu prostředí, jelikož postrádá pouzdro. Vyznačuje se také svou náročnou kultivací, kdy je doporučeno použití čokoládového agaru s příměsí antibiotik a antimykotik v prostředí s oxidem uhličitým, který využívá k růstu a jiným metabolickým procesům (Hurych a Štícha, 2021).



Obrázek 2: Kultivace *Neisseria gonorrhoeae* na čokoládovém agaru (zdroj: vlastní)

Závažné onemocnění, které tento patogen způsobuje, se nazývá kapavka. Jedná se o akutní zánět, jehož klasickým příznakem je hnisavý výtok z genitálu (Hurych a Štícha, 2021). Primárně postihuje sliznici urogenitálního traktu, může však způsobit i záněty oční spojivky, vzácně záněty dalších sliznic či rekta (Poláčková, 2016). *Neisseria gonorrhoeae* nadále způsobuje široké spektrum onemocnění od asymptomatické infekce přes lokalizovanou infekci slizničních membrán způsobující cervicitidu, uretritidu a faryngitidu až po diseminovanou infekci způsobující syndromy, jako je artritida, tenosynovitida a septická artritida (Hurych a Štícha, 2021).

Přenos bakterie mezi hostiteli probíhá majoritně pohlavním stykem, při kterém dochází k přímému kontaktu sliznic (Kuklová et al., 2015). Další možný druh přenosu nastává během porodu z matky na dítě, což může vést k zánětu spojivek s následnou možnou slepotou dítěte (ophthalmia neonatorum). Neléčené gonokokové infekce jsou spojeny se zvýšeným rizikem přenosu jiných závažných STD a komplikací, jako jsou zánětlivá onemocnění pánve a neplodnost. Infekce může vést k významným zdravotním následkům a pokračujícímu přenosu. Důležitým faktorem je tedy onemocnění včas rozpoznat, správně diagnostikovat a okamžitě léčit (Bennett et al., 2014).

Bakterie, má velký potenciál k rezistenci a riziko nevléčitelnosti infekce rapidně roste. WHO odhaduje, že každý rok se objeví 87 milionů nových případů kapavky. U *N. gonorrhoeae* se vyskytuje celosvětově vysoká prevalence rezistencí vůči téměř všem významným antimikrobiálním látkám, dříve a v současnosti široce dostupným pro léčbu, včetně sulfonamidů, penicilinů, tetracyklinů, makrolidů a chinolinů (Unemo et al., 2017). Tento mikroorganismus získal rezistenci jak bodovými mutacemi, tak přenosem genů z jiných bakterií. Výsledné mechanismy rezistence zahrnují změnu cílových struktur vázajících léčivo, dále sníženou penetraci antibiotika do buňky nebo naopak jejich zvýšené vylučování či inaktivaci antimikrobiálních látek (Unemo a Jensen, 2017). Vzhledem k rychlému vzniku rezistence existuje koordinovaná celosvětová spolupráce v čele s programem WHO Global Gonococcal Antimicrobial Surveillance (GASP), jejíž součástí je síť laboratoří, která shromažďuje a sleduje údaje z více než 60 zemí o antimikrobiální rezistenci (Unemo et al., 2019).

Materiál určený pro diagnostiku se nejčastěji odebírá u muže z uretry, u ženy z uretry a děložního hrdla. Mikroskopický nález gramnegativních diplokoků prakticky určuje

diagnozu. Přesnější diagnostika se provádí pomocí kultivace či PCR metodou (Beneš, 2009).

2.2.1.1 **Mutace v genech asociovaných s antimikrobiální rezistencí**

N. gonorrhoeae, obsahuje ve své DNA geny kódující proteiny, které jsou cílovými místy pro antibiotika, kdy dochází k zastavení růstu nebo usmrcení bakterie. Změnou v genu může dojít ke změně struktury proteinu a tím k oslabení nebo úplnému vyrušení interakce proteinu a antibiotika. V posledních letech byly popsány a jsou pozorovány časté změny v některých genech, nejčastěji mutace, které vedou k rezistenci na antibiotikum. Tím se léčba onemocnění použitím antibiotik stává složitější (Xiu et al., 2020). Mezi nejčastěji mutované geny u *N. gonorrhoeae* patří *penA*, *ponA*, *porB*, *mtrR*, *23S rRNA*, *gyrA*.

2.2.1.2 ***penA***

Gen *penA* kóduje protein vázající penicilin 2 značen zkratkou PBP z anglického „penicillin-binding protein“ (PBP2). Změna struktury v oblasti tohoto genu je primárně spojena se sníženou náchylností k β -laktamům. Protein PBP2 představuje důležitou transpeptidázu, která se podílí na tvorbě buněčné stěny (peptidoglykanu) (Zapun et al., 2016).

Všechny β -laktamové antimikrobiální látky jako jsou např. peniciliny či cefalosporiny (ESC), vykazují antimikrobiální účinek vazbou a inhibicí právě s PBP, které jsou nezbytné pro vložení síťových struktur do buněčné stěny (Tomberg et al., 2017). PBP2 je zvláště důležitý, protože vykazuje značnou afinitu vůči penicilinu (10krát větší než PBP1) a je tak hlavním cílem β -laktamových antibiotik (ATB) používaných k léčbě kapavky (Barbour, 1981). Začátkem 21. století byla v lokalitách s běžnou léčbou pomocí cefalosporinů pozorována snížená citlivost gonokokových kmenů na tato léčiva (Zapun et al., 2016). Kdy právě nejčastějším mechanismem snížení citlivosti na ESC u této bakterie je alterace genu *penA*, z důvodu získání mozaikové alely *penA* nebo změny aminokyseliny A501 v kódovaném PBP2 (Ohnishi et al., 2011).

2.2.1.3 ***ponA***

Gen značený jako *ponA* kóduje protein 1 vázající penicilin (PBP1) bakterie *N. gonorrhoeae*. Mutace aminokyseliny v *ponA* genu, která je způsobena jedinou změnou

báze v rámci celé kódující sekvence, byla pozorována v kmenech bakterie. Tato sekvenční změna dále indukuje chromozomálně zprostředkovanou vysokou úroveň odolnosti vůči penicilinu. Vzniklá rezistence tak může způsobit až dvojnásobné snížení minimální inhibiční koncentrace (MIC) penicilinu (Ropp et al., 2002). Dále byla zjištěna souvislost mezi mutacemi v *ponA* a sníženou citlivostí kmenů *N. gonorrhoeae* na širokospektrální cefalosporiny, jako je cefixim a ceftriaxon (Lee et al., 2010).

2.2.1.4 *mtrR*

Zkratka *mtr* pochází z anglického „multiple transferable resistance“, která je do češtiny přeložena jako mnohonásobná přenositelná rezistence. Mutace v tomto genu se běžně vyskytují mezi klinickými izoláty *N. gonorrhoeae* rezistentními vůči více léčivům (Ayala et al., 2022).

Systém vícenásobné přenositelné rezistence (Mtr) je efluxní pumpa, kterou tvoří tři části. Skládá se z vnitřní membrány (MtrD) a zevních membránových kanálů (MtrE), které jsou propojeny periplazmatickým membránovým fúzním lipoproteinem (MtrC). MtrCDE je tedy členem efluxních pump s hydrofobní a amfifilní efluxní rezistencí. Geny *mtrC*, *mtrD* a *mtrE* se nacházejí v operonu s jediným promotorem. Exprese *mtrCDE* je přímo regulována represorem a aktivátorem skupiny efluxních pump (Handing et al., 2018). Klinicky relevantní mutace způsobující nadměrnou expresi MtrCDE se mohou vyskytovat v represoru pumpy (*mtrR*) nebo v promotorové oblasti operonu *mtrCDE*. Tyto mutace způsobují zvýšenou rezistenci *N. gonorrhoeae* na ATB včetně penicilinu, erythromycinu, rifampinu a azithromycinu označeným zkratkou AZM (Warner et al., 2008). Mutace *mtrR* je předpokladem pro to, aby bakterie *N. gonorrhoeae* získala varianty porinu (*penB*), které propůjčují vysokou úroveň odolnosti vůči penicilinům a cefalosporinům označovaným zkratkou ESC (Olesky et al., 2006).

2.2.1.5 *porB*

Dalším genem je *porB*, který kóduje porin označovaný jako PorB. Mutace v *porB* způsobují změnu aminokyselin ve vnější membráně porinu a snížení influxu antibiotik. Kombinace mutací *porB* a *mtrR* přispívají ke zvýšení hodnot MIC na ESC (Zhao et al., 2009).

Nadměrná exprese efluxní pumpy způsobená změnami nukleových kyselin v genu *mtrR* zvyšuje úroveň efluxu antibiotika a následně vyvolává změny v genu *porB*, čímž se značně snižuje možnost vstupu antibiotika do bakterie (Thomas et al., 2019). Aminokyselinové substituce proteinu PorB na cílových pozicích 120 a 121 oligonukleotidu genu *porB* vedou ke změnám v MIC penicilinů, cefalosporinů a tetracyklinů. *PorB* mutace dále snižují difúzi antibiotika do periplazmatického prostoru v přítomnosti s *mtrR* nebo *mtr* promotorové mutace (Olesky et al., 2006).

Podle prováděných výzkumů bylo zjištěno, že kombinovaný výskyt mutací v genech *porB* a *mtr* zvýší MIC penicilinu z 0,12 mg/l na 1,0 mg/l a MIC tetracyklinu z 0,15 mg/l až 1,0 mg/l. Kombinovaná přítomnost mutací v těchto genech tedy značně zvyšuje MIC k těmto druhům antibiotik (Ropp et al., 2002).

2.2.1.6 **23S rRNA**

Další mutace vedoucí k antimikrobiální rezistenci, jsou genetické změny v oblastech genu pro 23S rRNA. Tím je ovlivněn účinek především azythromycinových antibiotik, označovaných zkratkou AZM. Jedná se o široce používané makrolidové antibiotikum (Hicks et al., 2011). Tento druh ATB se váže na bakteriální 50S ribozomální podjednotku na peptidyltransferázové části čímž narušuje syntézu proteinů (Gomes et al., 2019). Delece v genu pro 23S rRNA, významně snižují účinnost AZM a mají za následek vysokou úroveň rezistence na tento druh ATB u *N. gonorrhoeae* (Wan et al., 2018).

AZM slouží jako alternativní léčba u komplikovaných infekcí způsobených *N. gonorrhoeae* u osob s prokázanými těžkými alergickými reakcemi na peniciliny nebo cefalosporiny (CDC, 2007).

2.2.1.7 **gyrA**

Gen označovaný jako *gyrA* a jeho mutace u bakterie *N. gonorrhoeae* jsou spojovány se selháním účinku širokospektrých ATB označovaných jako fluorochinolony (Murray et al., 2019).

Fluorochinolony blokují replikaci DNA inhibicí enzymů DNA gyrázy (topoizomerázy II) a topoizomerázy IV (Levine et al., 1998). DNA gyráza katalyzuje rozvolnění

molekul DNA během replikace DNA a skládá se ze dvou podjednotek typu A a dvou podjednotek typu B kódovaných geny *gyrA* a *gyrB* (Drlica, 1999).

Komplex DNA-enzym-fluorochinolon inhibuje pohyb replikační vidlice, struktura vytvořená organizací replikačních proteinů a narušuje replikaci bakteriální DNA. Postupná akumulace bodových mutací v *gyrA* a *parC* vede k substitucím aminokyselin, které mění trojrozměrnou strukturu cílového proteinu. Změna struktury cílového proteinu snižuje vazebnou afinitu fluorochinolon-cílový enzym, což vede k rezistenci gonokoků (Bodoev a Il'ina, 2015).

2.2.2 *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis je obligátní intracelulární patogen (Záhumenský et al., 2015). Řadí se mezi gramnegativní bakterie a je častým a obávaným původcem urogenitálních zánětů a inkluzních konjunktivit, které konkrétně způsobují sérovary D-K. Celkem lze odlišit 18 sérovarů, pohlavní onemocnění zvané LGV (lymfogranuloma venereum) způsobují sérovary L1, L2a, L3 a sérovary A, B, Ba, C způsobují trachom (Horová, 2018).

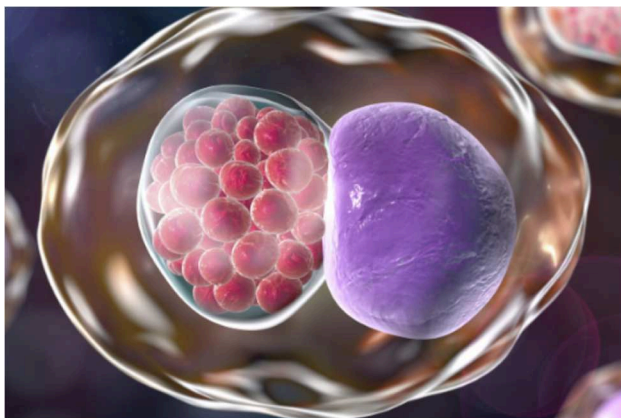
Při nákaze u mužů, dojde k tvorbě zánětů nadvarlat, prostaty a močové trubice. U žen bakterie způsobuje záněty děložního hrdla, sliznice těla dělohy a stejně jako u mužů způsobuje i záněty močové trubice. Zánětlivé stavy, které se u člověka tvoří v oblastech genitálu, mimořádně ohrožují jeho reprodukční zdraví. Včetně rizika neplodnosti mohou vznikat při nedostatečné léčbě genitálních infekcí i chronické komplikace, jako jsou zánětlivá onemocnění pánve, chronický zánět prostaty či mimoděložní těhotenství. Riziko představuje stále aktuálnější výskyt infekcí, způsobených tímto mikroblem (Záhumenský et al., 2015).

Chlamydie jsou celosvětově nejčastěji hlášenou bakteriální STD, s odhadovaným počtem 127 milionů případů chlamydiové infekce na celém světě (WHO). Výskyt je nejčastější u žen a mužů ve věku 14–25 let a celosvětový počet případů se každoročně zvyšuje. Zvýšený výskyt je pravděpodobně způsoben asymptomatickou infekcí a nevyhovující partnerskou léčbou (O'Connell a Ferone, 2016).

Příkladem vhodné antibiotické léčby u nekomplikovaných chlamydiových infekcí jsou azithromycin nebo doxycyklin. Při komplikované infekci nebo časté smíšené infekci se doporučuje kombinace antibiotik. Léčba by měla být dostatečně dlouhá, pro pokrytí

i inaktivních extracelulárně uložených kmenů chlamydií. Kombinace se systémovou enzymoterapií zvyšuje dostupnost účinné látky v postižené tkáni a zvyšuje účinnost léčby zejména u chronicky probíhajících zánětů (Záhumenský et al., 2015). Přestože se u lidských patogenních druhů *C. trachomatis* významně vysoká antibiotická rezistence neobjevila, mohou tyto mikroorganismy vyjadřovat významné rezistentní fenotypy. Popsaný byl například stabilní fenotyp rezistentní na tetracyklin (Donati et al., 2016).

Laboratorní diagnostika není vždy spolehlivá, proto je dobrá kombinace dvou odlišných testů s přihlédnutím k anamnéze a klinickému obrazu onemocnění. Rozhodující je průkaz agens v biologickém materiálu, jako jsou výtěry z uretry, rekta či cervixu. Mezi metody průkazu přítomnosti antigenů patří ELISA (z anglického enzyme-linked immuno sorbent assai), přímá imunofluorescence nebo detekce nukleové kyseliny chlamydií pomocí PCR (Beneš, 2009).



Obrázek 3: *Chlamydia trachomatis* (GeneProof, 2022)

2.2.3 *Mycoplasma genitalium*

Mycoplasma genitalium je oportunní patogen urogenitálního traktu, jehož přenos je zprostředkován pohlavním stykem (Hurych a Štícha, 2021). Tento patogen způsobuje nongonoroickou nonchlamydiovou uretritidu u mužů a cervicitidy u žen (Záhumenský et al., 2015).

Virulenci této bakterie představují specifické adheziny, které umožňují přilnutí bakterie k různým eukaryotickým buňkám, do kterých bakterie pronikne a tím způsobí jejich vážné poškození. Pokud tento patogen neindikuje STD svým vlastním působením, má schopnost zvýšit náchylnost k jiným druhům sexuálně přenosných patogenů (Yueyue et

al., 2022). Bakterie postrádá buněčnou stěnu. Obal tvoří pouze dvojvrstva fosfolipidů a proteinů s obsahem cholesterolu. Z důvodu absence buněčné stěny bývá *M. genitalium* velmi obtížně kultivovatelná a vyžaduje až týdny růstu (Hurych a Štícha, 2021).

M. genitalium je poměrně rozšířený mikrob, který je součástí vaginální flory zdravých, sexuálně aktivních žen. I když dominuje sexuální přenos této infekce, až 10 % sexuálně neaktivních dospělých a 5 % dětí je genitálními mykoplazmaty kolonizováno. U žen kolonizovaných *M. genitalium* se v 5 % vyvine zánětlivé onemocnění pánve a ve 22 % zánět děložního hrdla, naprostá většina infekcí, avšak zůstává bezpříznaková (Záhumenský et al., 2015).

Vzhledem k tomu, že *M. genitalium* postrádá buněčnou stěnu, antibiotika zacílená na syntézu buněčné stěny, jako jsou β -laktamy, jsou tedy ze své podstaty neúčinná. Makrolidy, proti kterým je dnes *M. genitalium* již rezistentní, byly první možnou terapií infekce. Alternativou jsou tedy fluorochinolony a tetracykliny. Rezistence však celosvětově rychle narůstá a alternativní terapie jsou omezené (Hughes a Saunders, 2018).

Problém představuje i skutečnost, že klinická diagnostika mykoplasmových infekcí je obtížná, jelikož jejich projevy jsou necharakteristické a připomínají celou řadu jiných onemocnění. Hlavní možností diagnostiky je nepřímý průkaz specifických protilátek metodou ELISA, dále nescifický test průkazu chladových aglutininů či PCR detekce z výtěru z nosohltanu nebo sputa (Beneš, 2009).



Obrázek 4: *Mycoplasma genitalium* (Warren, 2020)

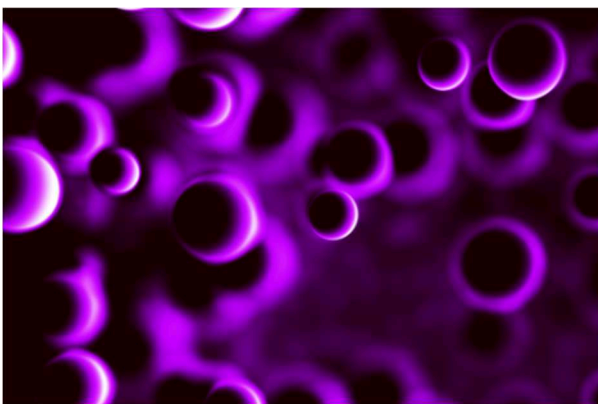
2.2.4 *Mycoplasma hominis*

Mycoplasma hominis patří stejně jako *Mycoplasma genitalium* mezi oportunní patogeny. Usidlují se v urogenitálním traktu a mohou vyvolat u žen endometritidu, hluboký zánět pánve, poporodní horečku či chorioamnionitidu. U mužů způsobují prostatitidy a negonokokové uretritidy, které je patogen schopen vyvolat pouze za výjimečných situací i u žen (Hurych a Štícha, 2021).

Virulence je založena na stejných principech jako u jiných druhů těchto patogenů. Bakterie se uchytí na povrchu hostitelských buněk a umožňuje organismu kolonizovat a následně produkovat patologické léze. Dalším zdrojem virulence jsou lipoproteiny, které se podílejí na přilnavosti na povrch buňky a cytotoxicitě (Ahmed et al., 2021).

Tento druh mycoplasmy je stejně jako ostatní velmi obtížně kultivovatelný, vzhledem k absenci buněčné stěny (Hurych a Štícha, 2021). Tato absence poskytuje *M. hominis* rezistenci vůči β -laktamovým antibiotikům stejně jako vůči sulfonamidům, trimethoprimu, rifampinu a všem dalším činidlům působícím na tvorbu bakteriální buněčné stěny (Ahmed et al., 2021). Rozlišení jednotlivých patogenů je možné biochemickou aktivitou, která se u jednotlivých druhů liší a lze ji tedy využít i v diagnostice (Hurych a Štícha, 2021).

Diagnostika je postavena na stejném principu jako u *M. genitalium*, protože i u této mykoplasmy je její klinická diagnostika obtížná. Diagnostika je zaměřena na průkaz specifických protilátek pomocí metody ELISA, dále je možná detekce DNA z výtěrů nosohltanu a diagnostika pomocí PCR (Beneš, 2009).



Obrázek 5: *Mycoplasma hominis* (GeneProof, 2022)

2.2.5 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis, též označovaná jako Bičenka poševní, spadá mezi bičíkovce podobně jako jiné trichomonády (Schindler, 2014). Tento bičíkový parazit oválného nebo hruškovitého tvaru byl poprvé popsán v roce 1836. Na svém povrchu má 5 bičíků a síť mikrotubulů, které slouží k adhezi k poševním epitelům. V tělních tekutinách přežívá 24 hodin a mimo tělo na kontaminovaných předmětech 1-2 hodiny. Přenos tohoto prvoka kontaminovanými předměty jako jsou ručníky či mýdla je možný a byl i popsán (Záhumenský et al., 2015). Jedná se však primárně o lidského patogena, který se přenáší pohlavním stykem (Hurych a Štícha, 2021).

Průběh infekce je často asymptomatický, kdy tato situace často přispívá k šíření, ale může se projevit jako vaginitida s nazelenalým, páchnoucím výtokem u žen a negonokokovou uretritidou u mužů. Asymptomatický průběh nemoci tak často uniká pozornosti a řada onemocnění způsobené trichomonádami není rozpoznána (Tien et al., 2020).

WHO odhaduje, že v roce 2016 bylo zaznamenáno 156 milionů případů trichomoniázy, což překonalo počet případů chlamydiových infekcí i kapavky (Rowley et al., 2019). Jako první možná léčba u trichomoniázy se doporučují nitroimidazoly, metronidazol a tinidazol (Tien et al., 2020). Nyní se však objevují kmeny, které se vyznačují svou rezistencí vůči metronidazolu. Klinická rezistence trichomoniáz na metronidazol byla poprvé popsána již v roce 1962 (Lossick a Kent, 1991).

Vzhledem k tomu, že rutinní testování citlivosti často není dostupné, jsou k dispozici pouze omezené informace a nedostatek relevantních údajů o prevalenci antimikrobiální rezistence u *T. vaginalis* (Tien et al., 2020).

Laborantně je infekce nejčastěji diagnostikována pomocí mikroskopického průkazu pohyblivých bičíkovců v nativním preparátu z poševních nátěrů u žen a z nátěru uretrálního sekretu u mužů. Následně se suchý nátěr obarví podle Giemsky-Romanowského. Další možností diagnostiky a vyšší možný záchyt než mikroskopie představuje kultivace trichomonád na speciálních půdách. V zahraničí je hojně používaný způsob diagnostiky pomocí PCR z poševního a uretrálního sekretu nebo močového sedimentu (Beneš, 2009).



Obrázek 6: *Trichomonas vaginalis* (GeneProof, 2022)

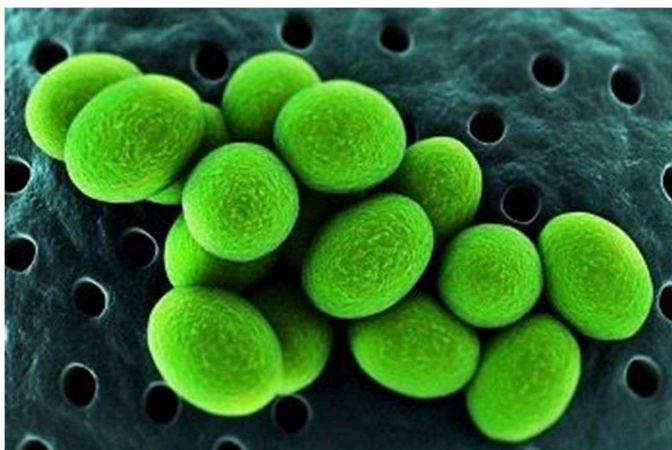
2.2.6 *Ureaplasma urelyticum* a *Ureaplasma parvum*

Tyto dva druhy oportunních patogenů patří mezi mykoplazmata, která jsou nejčastěji izolována z urogenitálního traktu. Jedná se o primárně lidské patogeny, které u žen způsobují hluboké záněty pánevního dna, záněty dělohy či poporodní horečky. U mužů ureaplasmy způsobují záněty prostaty a negonokokové záněty močové trubice (Hurych a Štícha, 2021).

U neléčených infekcí vyvolaných těmito druhy patogenů, může dojít k neplodnosti nebo komplikacím v těhotenství. V horších případech k onemocnění novorozence, které se projeví ve formě chronického onemocnění plic a retinopatie nedonošených (Kokkayil a Dhawan, 2015). Hlavním představitelem virulence je membránový protein, který je zodpovědný za pevnou adhezi na povrch napadených buněk (Hurych a Štícha, 2021).

Rezistence na antibiotika u ureaplazmat je stále důležitější otázkou, jelikož dochází k jejímu rychlému vzestupu. Rezistence byla hlášena na makrolidy, tetracykliny a fluorochinolony. Proto včasná diagnostika a zahájení vhodné antibiotické terapie je zásadní pro prevenci dlouhodobých komplikovaných infekcí (Kokkayil a Dhawan, 2015).

Shodně jako *M. genitalium* a *M. hominis* klinická diagnostika onemocnění je obtížná z důvodu necharakteristických projevů onemocnění. Možností je nepřímý průkaz specifických protilátek pomocí metody ELISA. Přímý průkaz infekcí je založený na detekci DNA pomocí PCR (Beneš, 2009).



Obrázek 7: *Ureaplasma* (Hussien, 2019)

3 Antimikrobiální rezistence

Antibiotika se vyznačují svým antimikrobiálním účinkem vůči bakteriím. Od svého objevu se staly nepostradatelnými při léčbě infekčních onemocnění. Mechanismy působení každé antimikrobiální skupiny jsou různé. Například mechanismem účinku β -laktamových ATB, do kterých patří druhy ATB jako karbapenemy, cefalosporiny, monobaktamy a penicilin, společně s ATB skupinou glykoproteinů je inhibice syntézy buněčné stěny. Dále lipopeptidy způsobují depolarizaci buněčné membrány a schopnost inhibovat syntézu proteinů vazbou na 30S či 50S ribozomální podjednotku mají aminoglykosidy, tetracykliny, vazbou na 30S ribozomální podjednotku (C Reygaert, 2018).

Přirozenou reakcí mikroorganismů, jakožto důsledku vývojového procesu, je vytvoření ochranného mechanismu rezistence. Tedy tvorba specifických genetických a fenotypových znaků, jejichž výsledkem je schopnost mikroorganismu vzdorovat antibiotickým účinkům (Schindler, 2014).

Rezistence představuje obrovskou hrozbu pro naše globální zdraví. Onemocnění, způsobené rezistentní infekcí vyžaduje použití dražších antibiotických druhů léčiv a tím i zvýšení nákladů léčby a prodlouženou rekonvalescencí pacienta. Nejméně pozitivním faktem je zvyšující se úmrtnost u pacientů trpících infekcemi, které způsobují rezistentní bakterie. Ke vzniku rezistentních kmenů dochází v nemocnicích, ale i v různém komunitním prostředí. (Urbášková a Hrabák, 2012).

Rezistenci na antibiotika uplatňují bakteriální buňky několika mechanismy. Sníženou absorpcí léčiva, modifikací cíle léčiva, inaktivací léčiva nebo aktivním efluxem léčiva. Tyto mechanismy mohou být přirozené (primární rezistence) nebo získané (sekundární rezistence) vlastními bodovými mutacemi nebo přenosem genů od jiných organismů (Reygaert, 2018).

Druhy některých bakterií mají schopnost omezovat příjem antimikrobiálních látek. Příkladem jsou G-bakterie, které omezují příjem ATB díky struktuře a funkci vrstvy lipopolysacharidů. Dalším příkladem jsou mykobakterie, které mají vysoký obsah lipidů a jsou tak odolné vůči hydrofobním lékům. Také bakterie bez buněčné stěny jsou rezistentní na ATB, která své působení cílí právě na buněčnou stěnu (Blair et al., 2014).

3.1 Primární druh rezistence

Primární rezistence se také označuje jako rezistence přirozená (Rozsypal et al., 2013). Jedná se o druhovou vlastnost mikroba, pro kterou je typická přirozená necitlivost k danému ATB. Nejčastěji se jedná o absenci cílové struktury nebo přítomnost mechanismu rezistence. Uvedeným příkladem může být výskyt přirozené rezistence gramnegativních bakterií na glykopeptidy nebo primární rezistence u *Klebsiella* spp. na ampicilin (Hurych a Štícha, 2021). Hlavní příčinou vzniku tohoto druhu rezistence bývá zpravidla odlišnost ve struktuře bakteriální buňky. Bakterie se stane přirozeně rezistentní hned z několika důvodů. Například nemá transportní systém, který by ATB dopravil do buňky, nebo naopak postrádá cílovou strukturu, proti které má ATB účinkovat. Jedním z důvodů může také být i nepropustnost bakteriální stěny (Schindler, 2014). Přirozená rezistence se i u některých druhů bakterií objevila právě při léčbě infekčních onemocnění pomocí ATB (Beneš, 2018).

Primární druh rezistence může být využit i ve vyšetřovacích metodách při použití jednotlivých kultivačních půd. Po přidání ATB do kultivačního média dojde k potlačení ostatních mikroorganismů a na půdě vyrostě jen rezistentní druh bakterie, který chceme vykultivovat (Hurych a Štícha, 2021).

3.2 Sekundární druh rezistence

Sekundárním druhem rezistence je rezistence získaná. Získaná rezistence je stav, kdy se původně citlivý zástupce určitého bakteriálního druhu stane rezistentním (Hurych

a Štícha, 2021). Získání tohoto druhu rezistence spočívá v přenosu genetické informace, která se může uskutečnit u buněk pocházejících z různých klonů i dokonce mezi buňkami jiných druhů, rodů nebo jiných vyšších útvarů (Beneš, 2018). Geny jedné buňky se mohou přenést na řadu dalších buněk za pomoci plazmidů nebo jiných mobilních genetických elementů. Geny se nacházejí uvnitř plazmidů ve formě mnoha kopií a ty jsou následně přeneseny. Další možnost přenosu genů rezistence mezi buňkami je bakteriofágem nebo za pomoci volné DNA či tranpozomu (Schindler, 2014).

Přenos, za kterým stojí výměna DNA v jedné generaci bakterií, označujeme jako přenos horizontální. Opakem je pak přenos vertikální, u kterého dochází k předání mechanismů rezistencí z jedné generace bakterií na další (Hurych a Štícha, 2021).

3.3 Multirezistentní kmeny

Multirezistence je stav, kdy jsou bakterie rezistentní k více antibiotickým třídám. Bakterie rezistentní ke všem antibiotikům označujeme jako panrezistentní. V některých případech může dojít k neúčinnosti antibiotické terapie, i když stanovení citlivosti neprokázalo rezistentní fenotyp. Příčinou může být přežívání bakterií v buňkách, do kterých se následně ATB nedostane, například v makrofázích. Častý je také růst bakterií v podobě biofilmu, kdy poté odolávají běžným dávkám antibiotik (Hurych a Štícha, 2021).

Počet multirezistentních bakterií se v posledních desetiletích zvýšil alarmujícím tempem a způsobují vážné problémy. Mezi závažné dopady působení multirezistence patří zvýšené riziko selhání léčby a recidivujících infekcí. Infekce multirezistentními bakteriemi jsou asociované se zvýšenou nemocností a úmrtností, což má za následek mimojiné i rostoucí náklady na zdravotní péči (Huemer et al., 2020).

4 Molekulární diagnostika sexuálně přenosných infekcí

Pro správnost diagnostiky onemocnění je nutností provést podrobné klinické vyšetření. Jeho součástí je důsledné zjištění anamnézy, která zahrnuje rizikové chování a sexuální praktiky pro zvolení místa odběru a druhu biologického materiálu potřebného pro vyšetření. Pro molekulárně genetické metody je velmi důležité dodržovat návod výrobce a omezení týkající se validity vyšetření pro vzorky z různých odběrových míst.

Vyšetření prováděné u nestandardních materiálů je vhodné konzultovat s laboratorním specialistou (Zákoucká, 2020).

STD byly dříve diagnostikovány klasickými nemolekulárními metodami, jako je mikroskopie nebo kultivace izolátů z klinických vzorků. Tyto přístupy se stále používají, ale ne tak často, spíše pro potvrzení diagnózy pacienta a účinku léčby (Caruso et al., 2021). Mikroskopie je levná metoda, která nevyžaduje speciální vybavení, avšak citlivost je ovlivněna zkušenostmi odborného pracovníka. Rizikem může být asymptomatické nosičství u infekcí, jako je kapavka či trichomoniáza (WHO). Další nemolekulární metodou je kultivace organismů pomocí specifických médií, která vykazuje vysoké procento citlivosti a specifity, ale jde o pomalý proces, který často trvá až několik dní v závislosti na organismu. Proto se v dnešní době laboratoře více přiklánějí k diagnostice nemoci pomocí molekulárních metod, jako je analýza pomocí PCR či sekvenování (Fournier et al., 2013).

Tyto přístupy mají potenciál být přímo aplikovány na klinické vzorky a zahrnují metody založené na detekci specifických sekvencí DNA. Výhodou dostupných molekulárních metod je možnost diagnostiky již z klinického izolátu bez potřeby kultivace. Metody jsou zároveň citlivé, rychlé, a navíc schopné diagnostikovat jak druh, tak profil lékové rezistence infekčního agens (Kathuria et al., 2015). Nejčastějším principem molekulárního testu je PCR v reálném čase (Real-time PCR).

4.1 Real-time PCR

Real time PCR, nazývaná také jako kvantitativní real-time PCR, nebo kinetická PCR je v dnešní době skvěle zavedenou metodou pro detekci, kvantifikaci a typizaci různých druhů mikrobiálního agens v klinické oblasti (Kralik a Ricchi, 2017).

Jedná se o amplifikace DNA, která je detekována a kvantifikována pomocí fluorescenčního reportérového signálu, který zvyšuje přímo úměrně množství PCR produktu v reakci. Fluorescenční reportér je excitován světlem v přístroji v každém PCR cyklu a následně je detekována fluorescence. Zaznamenáním množství fluorescenční emise v každém cyklu může být PCR monitorována během exponenciální fáze, kdy první významné zvýšení množství produktu koreluje s počátečním množstvím cílového templátu (Green a Sambrook, 2018).

Na principu real time-PCR je i založena řada komerčních souprav.

5 Komerčně dostupné kity

Jednotlivých molekulárně diagnostických souprav a přístrojů zaměřených na detekci původců STD je na trhu velké množství. Komerční soupravy mohou být v monoplexovém, kdy je detekován jeden konkrétní patogen nebo v multiplexovém uspořádání, kdy je detekováno více původců STD zároveň.

Tabulka 1: Přehled komerčních souprav určených pro molekulární diagnostiku STD

Systém	Kit
AusDiagnostics	STI 16-well (Ref 27112)
	Urinogenital 8-well (Ref 27113)
	Urinogenital and Resistance 12-well (Ref 87123)
EliGene	EliGene® Chlamydia trachomatis UNI Kit
	EliGene® Neisseria UNI Kit
	EliGene® Ureaplasma UNI Kit
	EliGene® Mycoplasma hom/gen UNI Kit
ProofGene	GeneProof Chlamydia trachomatis PCR Kit
	GeneProof Neisseria gonorrhoea PCR Kit
	GeneProof Mycoplasma genitalium/hominis PCR Kit
	GeneProof Ureaplasma PCR Kit
	GeneProof Trichomonas vaginalis PCR Kit
	GeneProof CT/NG/MG PCR Kit
	GeneProof MH/UU/UP PCR Kit

5.1 *AusDiagnostic*

Systém AusDiagnostics, konkrétně panel „URINOGENITAL AND RESISTANCE (12-WELL)“, představuje molekulárně-biologickou platformu sloužící pro diagnostiku patogenů, kdy práci se systémem by měl provádět vhodně a dostatečně vyškolený personál v kvalifikovaných laboratořích. (Stanley a Szewczuk, 2005).

Systém zachycuje široké spektrum mikrobiálních patogenů v krátkém čase. Díky této platformě je možnost detekovat druhy onemocnění, které způsobují patogeny v oblasti respiračního, gastrointestinálního a urogenitálního traktu či původce dermatomykóz. Součástí platformy jsou multiplexní panely, které jednotlivé detekce umožňují. Pro semi-automatickou kvantifikaci tato platforma využívá velice citlivou a účinnou metodu multiplex tandem real-time polymerázovou řetězovou reakci (MT-PCR) (AusDiagnostics, 2019). MT-PCR je proces pro vysoce multiplexní profilování genové

exprese a jedná se o klíčovou techniku v molekulární biologii, která umožňuje amplifikaci specifických sekvencí DNA z komplexních směsí jednotlivých genových nukleových kyselin (Stanley a Szewczuk, 2005).

Vzorky, kdy se jedná typicky o extrakty nukleových kyselin, popřípadě primární materiál jako jsou moče na STD, jsou pipetovány přímo do označených stripů, které jsou specifické pro každou diagnostickou soupravu. Obsahují směs všech potřebných lyofilizovaných primerů, díky kterým může následně proběhnout krátká multiplexní preamplifikační reakce, ve které je směs primerů homologních ke všem detekovaným cílům a každý pár těchto primerů je specifický pro jeden cíl (AusDiagnostics, 2019).

Pipetování je zajištěno pomocí robota Easy-Plex, který automaticky pipetuje mastermix, vodu a olej (AusDiagnostics, 2019). Nejprve probíhá amplifikace, pokud se tedy nejedná o RNA templát, v tomto případě nejprve proběhne reverzní transkripce na cDNA templát. Olej se přidává do reakce kvůli zabránění vypařování reakční směsi v průběhu amplifikace (Stanley a Szewczuk, 2005).

Vzniklé PCR produkty jsou ředěny vodou a mastermixem pro správné proběhnutí amplifikace. Naředěné produkty jsou alikvotovány do jednotlivých pozic mikrotitrační destičky, kdy součástí mikrotitrační destičky je jeden lyofilizovaný pár primerů v každé jamce, specifických pro jeden konkrétní cíl. Výsledkem činnosti pipetovacího robota je tedy napipetovaná mikrotitrační destička, která je následně umístěna do RT-PCR analyzátoru HighPlex (AusDiagnostic, 2019).

Přítomnost fluorescenční barvy v reakci emituje fluorescenční záření v případě, kdy je interkalována do dvoušroubovicové DNA (Stanley a Szewczuk, 2005). Zvýšení fluorescence probíhá při amplifikaci a je odečítána analyzátozem. Po skončení reakce jsou všechna data softwarově vyhodnocena a poskytnou informaci o přítomnosti patogena a jeho případné kvantitě a specifitě amplifikovaného úseku DNA, kdy právě tento systém se využívá na Ústavu lékařské mikrobiologie ve Fakultní nemocnici v Motole (AusDiagnostic, 2019).

5.2 GeneProof

Mezi další platformy patří i GeneProof, který pracuje na stejném principu jako systém AusDiagnostics. Jedná se opět o reakci založenou na MT-PCR. Tento PCR kit slouží k diagnostice STI a odhalení bakteriálního agens (Pereyre et al., 2022).

Detekce konkrétně u kitu určeného pro diagnostiku bakterií jako jsou *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* a *Mycoplasma genitalium* spočívá v amplifikaci genů specifických pro jednotlivé bakteriální agens a v měření nárůstu fluorescence. Přítomnost jednotlivých bakterií je indikována rozdílnými druhy fluoroforem. Pro kontrolu celého diagnostického procesu, tím je myšleno účinnost extrakce DNA a účinnost PCR amplifikace, je používána interní kontrola, která je součástí PCR kitu. Interní kontrola pozitivní amplifikace je detekována ve fluorescenčním kanálu. Detekční souprava využívá technologii minimalizující nespecifické reakce a zajišťující maximální citlivost (GeneProof, 2022).

5.3 *EliGene*

Kit EliGene *Neisseria* UNI je určen pro DNA diagnostiku patogenních druhů *Neisseria gonorrhoeae* z izolovaného vzorku DNA. Tato diagnostická souprava je stejně jako předešlé systémy založena na metodě RealTime PCR. V této sadě jsou použity primery a sondy pro detekci DNA *Neisseria gonorrhoeae*. Systém EliGene má další kity určené pro diagnostiku jiných původců STD stejně jako u předchozích kitů jiných systémů. Diagnostika je zaměřena na bakterie, jako *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* a bakterie rodu *Ureaplasma sp.* (EliGene, 2022).

6 Cíle práce a hypotézy

6.1 Předkládaná práce má dva stěžejní cíle:

1. Retrospektivní analýza vzorků výtěrů nebo močí pozitivních na přítomnost *N. gonorrhoeae* bude sloužit k zjištění předpokládaného rezistomu na základě detekce mutací asociovaných s antimikrobiální rezistencí.
2. Optimalizace izolace DNA z PCR pozitivních vzorků výtěrů a močí pro celogenomové sekvenování, které by nahradilo cílově specifickou PCR se sekvencí PCR amplikonů.

6.2 Hypotézy:

Hypotézy nebyly pro tento typ studie stanoveny. Retrospektivní analýzou PCR pozitivních, ale kultivačně negativních vzorků na přítomnost *N. gonorrhoeae* zjistíme, zda nedochází k šíření multirezistentních kmenů, jejichž výskyt byl zaznamenán v několika evropských zemích. Pro budoucí sledování výskytu genů/mutací asociovaných s antimikrobiální rezistencí bude využito celogenomového sekvenování. Vzhledem k současné přítomnosti lidské DNA v těchto vzorcích není jasné, zda výsledné sekvenční pokrytí patogena(ů) bude dostatečné k detekci jednotlivých genů a mutací. Je tedy nutné DNA extrakci optimalizovat pro tento typ vzorků.

7 Metodika

7.1 Materiál

7.1.1 Pacientské vzorky

V rámci bakalářské práce byly použity odebrané vzorky moče či urogenitální výtěry od pacientů (hospitalizovaných i ambulantních) z Fakultní nemocnice Motol. Vyšetření bylo provedeno pomocí CE-IVD diagnostické soupravy (multiplexové PCR, AusDiagnostics). Pro zavedení metod detekce rezistence u *N. gonorrhoeae* byly použity PCR pozitivní, ale kultivačně negativní vzorky na přítomnost této bakterie z let 2018-2022.

7.1.2 Primery pro PCR

Tabulka 2: Primery použité při experimentech prováděných v rámci bakalářské práce

Cílový gen	Číslo primeru	Primer	Oligonukleotid	Reference
<i>penA</i>	357	NG-penA-F1	5'-CGGGCAATACCTTTATGGTGGAAC-3'	(Ito et al., 2005)
	358	NG-penA-R1	5'-AACCTTCCTGACCTTTGCCGTC-3'	
<i>ponA</i>	361	NG-ponA-F1	5'-CGCGGTGCGGAAACTATATCGAT-3'	(Ropp et al., 2002)
	362	NG-ponA-R1	5'-AGCCCGGATCGGTTACCATACGTT-3'	
<i>porB</i>	363	NG-ponA-F1	5'-CAAGAAGACCTCGGCAA-3'	(Martin et al., 2004)
	364	NG-ponA-R1	5'-CCGACAACCACTTGGT-3'	
<i>mtrR</i>	359	NG-mtrR-F1	5'-AACAGGCATTCTTATTTTCAG-3'	(Mavroidi et al., 2001)
	360	NG-mtrR-R1	5'-TTAGAAGAATGCTTTGTGTC-3'	
23S rRNA	365	NG-23S-F1	5'-TACATGCAAGTCGATCGGAAGTAGC-3'	(Ng et al., 2002)
	366	NG-23S-R1	5'-AAACTCCAGCCATTGCCTGCTAG-3'	
<i>gyrA</i>	367	NG-gyrA-F1	5'-TCCGCCACGACCACAAATTC-3'	(Allen et al., 2011)
	368	NG-gyrA-R1	5'-CTGCCAGCATTTTCATGTGAG-3'	

7.1.3 Primery pro PCR s HRM

Tabulka 3: Primery použité při experimentech prováděných v rámci bakalářské práce (Xiu et al., 2020)

Cílový gen	č. primeru	Primer	Oligonukleotid
<i>penA</i>	337	NG-penA-F_HRM	5'-GTGTGATTGTGGCGGTAAC-3'
	338	NG-penA-R_HRM	5'-GACCGGACCTGTCACTAC-3'
	343	NG-penA-F_HRM	5'-TCGGCTACCGTACAAGATAC-3'
	344	NG-penA-R_HRM	5'-GGTACCGACGTTGGAAGA-3'
	355	NG-penA-F_HRM	5'-CCGGCGGCGGGTTTCGATGTCGGCGCTAAA-3'
	356	NG-penA-R_HRM	5'-CGGCGGCCGCTAGCGGCCATTGACCAGTTT-3'
<i>ponA</i>	353	NG-ponA-F_HRM	5'-TTGGGCGGTGGTTCAAGAG-3'
	354	NG-ponA-R_HRM	5'-TGCATCCAGCGAAACCAAAG-3'
<i>porB</i>	335	NG-porB-F_HRM	5'-sGAACAGCCCCCTGAAAAACAC-3'
	336	NG-porB-R_HRM	5'-CCGGATTCCCAAGCATTGAC-3'
<i>mtrR</i>	347	NG-mtrR-F_HRM	5'-CCGGCGGCGGACGAAATCGCCCAAGCCG-3'
	348	NG-mtrR-R_HRM	5'-CGGCGGCCGCTTTTTGAAATGCCAATAGAGCG-3'
	349	NG-mtrR-F_HRM	5'-GCACTTTTTTCGAGCGGCTG-3'
	350	NG-mtrR-R_HRM	5'-AACAGGATGTTGTGGAATTTGTAG-3'
<i>23S rRNA</i>	345	NG-23SrRNA-F_HRM	5'-CGTCGTGAGACAGTTTGG-3'
	346	NG-23SrRNA-R_HRM	5'-CGGTCCTCTCGTACTAGG-3'
	351	NG-23SrRNA-F_HRM	5'-ACTCAGCGAAGTTGAAGTGGT-3'
	352	NG-23SrRNA-R_HRM	5'-TACAGTAAAGTTACACGGGGTC-3'
<i>porA</i>	341	NG-porA-F_HRM	5'-TAATTGGAGACTGATTGGGTGT-3'
	342	NG-porA-R_HRM	5'-CGCATATCGGCTTCCTTTTGTA-3'
<i>Opa</i>	339	NG-opa-F_HRM	5'-CCGGCGGCGTTCAGCACCTTAGGGAACCG-3'
	340	NG-opa-R_HRM	5'-CGGCGGCCGTGGCGGATGAACAAAAACCG-3'

7.1.4 *Chemikálie a kity*

Tabulka 4: Chemikálie a kity použité při experimentech v rámci bakalářské práce

Název	Výrobce
QuantiTect SYBR® Green PCR Kit	© QIAGEN
DNeasy® Blood & Tissue Kit	© QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	© QIAGEN
AMPure XP	Beckman Coulter
Agencourt® CleanSEQ	Beckman Coulter
Nextera XT DNA Library Preparation Kit	Illumina®
High-Sensitivity DNA Library Preparation Kit	Illumina®
BigDye® Direct Sanger Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific
Applied biosystems 3130xl	Thermo Fisher Scientific
Saponin a TritonX-100	Sigma Aldrich
Turbo DNase Buffer	ThermoFisher Scientific
Turbo DNase	ThermoFisher Scientific
SeaKem® LE Agarose	Lonza
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	Biotium
Electrophoresis power supply EV1450	Consort

7.2 *Metody*

7.2.1 *Izolace bakteriální DNA*

Zásadním krokem bylo získání izolované bakteriální DNA, aby mohly být následující kroky experimentální části uskutečněny. Tento krok, nebyl prováděn v průběhu praktické části bakalářské práce, ale byly použity již izolované DNA pozitivní vzorky. Avšak izolace je prováděna následujícím způsobem.

Nejprve proběhlo vytemperování všech potřebných reagentů na pokojovou teplotu. Nejprve je napipetováno 20 µl QIAGEN protézy na dno 1,5 ml eppendorf mikrozkušavky a poté přidáno 200 µl vzorku. Do stejné mikrozkušavky bylo přidáno 200 µl pufru AL (lyzační pufr), směs se vortexuje po dobu 15 sekund. Dále byl vzorek inkubován při 56 °C po dobu 10 minut v termobloku. Po 10 minutách byla teplota zvýšena na 95 °C a vzorek se dále inkubuje dalších 15 minut. Inkubace při 96 °C vede

k inaktivaci některých infekčních agens, ale neovlivňuje výtěžek DNA. Po inkubaci v termobloku se vzorek krátce stočí na stolní centrifuze pro odstranění kondenzátu z víčka a přidá se 200 μ l absolutního etanolu. Po přidání absolutního etanolu byl vzorek promíchán na vortex mixeru po dobu 15 sekund a opět stočen na stolní centrifuze. Takto připravená směs byla napipetována do QiaAmp kolonky umístěné v 2 ml sběrné zkumavce. Kolonka ve sběrné zkumavce byla centrifugována při 13 000 ot., po dobu 1 minuty. Po skončení centrifugace v kolonce zůstala požadovaná směs a odpadní filtrát ve sběrné zkumavce, proto proběhlo přendání kolonky do nové sběrné zkumavky a předešlá byla s odpadním filtrátem po centrifugaci vyhozena. Po opatrném otevření kolonky bylo provedeno přidání 500 μ l promývacího pufu AW1 a opakovaná centrifugace při 13 000 ot. po dobu 1 minuty. Dále byla kolonka přendána do nové sběrné zkumavky a byla odstraněna stará zkumavka s odpadním filtrátem. Poté bylo přidáno 500 μ l pufu AW2 a opět proběhla centrifugace při 13 000 ot., po dobu 3 minut. Následně byla kolonka přenesena do otevřené a označené eppendorf mikrozukavky a sběrná zkumavka s odpadním filtrátem byla vyhozena. Do kolonky po centrifugaci bylo přidáno 100 μ l pufu AE a proběhla inkubace po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubace proběhla centrifugace při 13 000 ot. 1 minutu. Po poslední centrifugaci, jsme získali roztok izolované DNA, který se uvolnil do eppendorf mikrozukavky. Z této zkumavky byla odstraněna kolonka a obsah na dně byl přepipetován z jedné eppendorf mikrozukavky do čisté označené zkumavky se šroubovacím víčkem.

7.2.2 *Celogenomové sekvenování (WGS)*

WGS neboli masivně paralelní sekvenování umožňuje sekvenaci celého genomu bakterie (Fricke a Rasko, 2014). Před vlastním sekvenováním je nutné jednotlivé vzorky upravit, jedná se o tzv. přípravu knihovny, kdy je DNA fragmentována, jsou připojeny další sekvence (adaportory a indexy). Knihovna jednotlivých vzorků se poté pipetuje dohromady v ekvimolárním poměru. Vlastní sekvenování probíhá na některém sekvenátoru nové generace. Nejrozšířenější jsou sekvenátory Illumina. Po sekvenaci jsou získány krátké sekvence 150-250 párů bazí ve fastq formátu. Tyto krátké sekvence se pomocí bioinformatického softwaru buď tzv. assemblují *de novo*, kdy dochází k jejich spojování podle překryvů jednotlivých krátkých sekvencí nebo se tzv. mapují na referenční genom vybrané bakterie. Referenční genomy jsou dostupné v National library of Medicine (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

WGS se v klinické mikrobiologii používá k charakterizaci izolátů, zjišťování mechanismů rezistence, virulence, příbuznosti jednotlivých kmenů pro epidemiologické účely a ke zkoumání adaptability bakteriálních kmenů při chronických infekcích např. u pacientů s cystickou fibrózou. Identifikace kmenů založená na WGS poskytuje mnohem lepší rozlišení ve srovnání s přístupy založenými na genetických markerech (Balloux et al., 2018).

V první fázi projektu byla pro přípravu knihovny primárně použita DNA tří klinických vzorků moče nebo výtěru pozitivního na některého z původců STD (viz tabulka 10). Knihovna pro celogenomové sekvenování byla připravena pomocí Nextera XT kitu s přidáním indexů (kitA). Vzorky byly sekvenovány společně s dalšími bakteriemi z jiných projektů, sekvenování proběhlo na sekvenátoru NextSeq (Illumina). Krátké sekvence (150pb) byly mapovány na referenční genomy *N. gonorrhoeae*, *U. urealiticim*, *C. trachomatis* získané z National library of Medicine (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) pomocí softwaru Geneious. Vzhledem k téměř nulovému pokrytí referenčních genomů, zřejmě kvůli vysokému podílu humánní (kontaminující DNA) jsme se pokusili o úpravu vzorku (odstranění DNA, viz kapitola 7.2.3) před přípravou knihovny. Příprava knihovny, sekvenování a analýza byla provedena na stejném principu, jako je uvedeno výše.

7.2.3 Úprava vzorků na WGS – odstranění humánní DNA

K odstranění humánní DNA z biologických vzorků pozitivních na některého z původců STD (tři vzorky moče, jeden urogenitální výtěr, uvedeno v tabulce 10) bylo provedeno podle prokolu publikovaném autory (Fong et al., 2020) použitím saponinu a tritonuX-100. Jedná se o dva chemické detergenty pro selektivní lýzu.

Úprava vzorku probíhala následovně: 200 μ l vzorku bylo smícháno s 1 % saponinem a 1 % tritonX-100. Vzorky byly poté vortexovány po dobu 10 sekund a inkubovány při teplotě místnosti po dobu 5 minut. Dále byl přidán 20 μ l Turbo DNase Buffer a 2 μ l DNase. DNA z takto upraveného vzorku byla izolována stejným protokolem, jako bylo popsáno v kapitole 7.2.1.

Následně byla provedena opět analýza pomocí platformy AusDiagnostics, stejnou soupravou, kterou byla provedena i detekce původců STD. Tato diagnostická souprava

poskytuje informaci o počtu kopií lidské DNA a DNA konkrétního detekovaného patogena.

7.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)- obecný princip

Název polymerázová řetězová reakce a její zkratka PCR pochází z anglického názvu „Polymerase chain reaction“. V dnešní době je PCR považována za nepostradatelnou diagnostickou metodu v molekulární biologii a mnoha jiných oborech (Maheaswari et al., 2016). Metodu PCR vynalezl v roce 1983 Kary Banks Mullis (Saiki et al., 1985), díky kterému se věda opět posunula kupředu. V současnosti byl základní postup PCR modifikován, rozšířen a aplikován na širokou škálu problémů a technik, čímž vznikl velmi dlouhý seznam specializovaných aplikací (Waters a Shapter, 2014).

PCR umožňuje získat *in vitro* replikací více kopií fragmentu DNA. Jako templát pro PCR reakci může být použita genomická DNA i komplementární DNA získaná pomocí reverzní transkripce z izolované RNA. PCR reakce zahrnuje tři cyklicky se opakujících fáze: denaturace, hybridizace primery a elongace. Produkty každého kroku syntézy slouží jako templát pro následující kroky, čímž je dosaženo exponenciální amplifikace (L. Nagpal et al., 2020). Cyklus tří teplokroků se opakuje přibližně 30-40x (Lorenz, 2012). V PCR reakční směsi je nutné mít následující komponenty: Taq DNA polymerázu, pufr, dNTPs, ultračistou vodu, primery a templát DNA.

7.3.1 PCR s analýzou křivky tání (HRM)

Analýza tání s vysokým rozlišením (HRM analýza) je kvantitativní analýza křivek tání PCR amplikonů. HRM je jednoduchá, rychlá a nenákladná metoda k identifikaci genetických variant v sekvencích nukleových kyselin. Před provedením analýzy HRM je pro získání přesných a spolehlivých výsledků nezbytná optimalizace návrhu primeru, směsi PCR a nastavení softwaru (Kim et al., 2023). Princip této analýzy je v detekci úbytku fluorescence, způsobené postupným zahříváním PCR amplikonů, což vede k jejich denaturaci a uvolňováním fluorescenčního barviva navázaného do dvojšroubovice DNA.

Vhodnost použití HRM bylo publikováno pro identifikování různých molekulárních markerů asociovaných s rezistencí k řadě antibiotik jako např. cefalosporiny

s rozšířeným spektrem (ESC) a azithromycinem (AZM) u *N. gonorrhoeae* (Xiu et al., 2020).

PCR amplifikace s následnou analýzou tání byla provedena následovně: Pro každý gen byla připravena PCR reakční směs (viz tabulka 5). Pro PCR s HRM byly použity primery z publikace (Xiu et al., 2020), (označené čísla **335 - 356**). Jako vzorek byla použita DNA z pozitivního vzorku moče na přítomnost *N. gonorrhoeae*. Analýza byla provedena v přístroji LightCycler® Nano Real-Time PCR Instrument s následujícím teplotním profilem:

Počáteční denaturace při 96 °C 15 minut, dále 34 cyklů: 96 °C 1 minuta, 60 °C 1 minuta a 30 sekund, 72 °C jedna minuta a finální elongace při 72 °C 10 minut. Analýza křivky tání probíhala od 70 °C do 95 °C, zvýšení o 0,5 °C za 1 sekundu.

Tabulka 5: Pipetovací protokol pro PCR s HRM analýzou

SYBR Green	10 µl
H ₂ O	6,5 µl
primer forward	0,75 µl
primer reverse	0,75 µl
DNA	2 µl
Objem jedné pozice	20 µl

7.3.2 *PCR amplifikace jednotlivých genů N. gonorrhoeae pro Sangerovo sekvenování*

PCR Amplifikace byla provedena v monoplexu vždy s konkrétní dvojicí primerů, které amplifikovaly vybraný úsek DNA. Reakční PCR směs pro jeden vzorek je uvedena v tabulce č. 6. Připravený master mix jsme rozpipetovali do jednotlivých mikrozkušavek. Jako vzorek byla použita DNA klinického vzorku pozitivního na přítomnost DNA bakterie *N. gonorrhoeae*. V negativní kontrole byl vzorek DNA nahrazen vodou. Teplotní profil pro PCR amplifikaci je uveden v tabulce č. 7.

V prvním kroku jsme použili anealingovou teplotu publikovanou autory (Xiu et al., 2020). Vzhledem k nespecifitě PCR amplikonů na elektroforéze (viz obrázek 8) byla provedena gradientová PCR a to následovně: výše uvedená PCR reakční směs se

připraví pro osm separátních jamek. V cycleru je nastaven gradientový program, což znamená, že v každé z osmy jamek bude odlišná anealingová teplota v teplotním rozmezí od 55-65 °C. Podle síly a ostrosti proužků PCR amplikonů po separaci v agarové elektroforéze je vybrána optimální teplota pro PCR amplifikaci. Pro daný PCR amplikon musí být přítomen pouze jeden proužek očekávané délky, jinak je nasedání primerů nespecifické.

Tabulka 6: Pipetovací protokol pro PCR amplifikaci jednoho vzorku

H ₂ O	6,5 µl
SYBR Green	10 µl
primer forward	0,75 µl
primer reverse	0,75 µl
DNA	2 µl
celkový objem	20 µl

Tabulka 7: Amplifikační protokol pro PCR

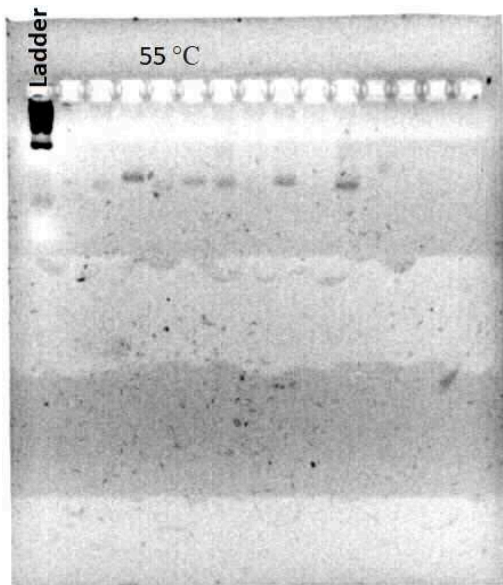
96 °C	15 min	1 cyklus
96 °C	60 sec	35 cyklů
55 °C	90 sec	
72 °C	60 sec	
72 °C	10 min	1 cyklus

7.3.3 *Kontrola PCR amplikonů pomocí gelové elektroforézy*

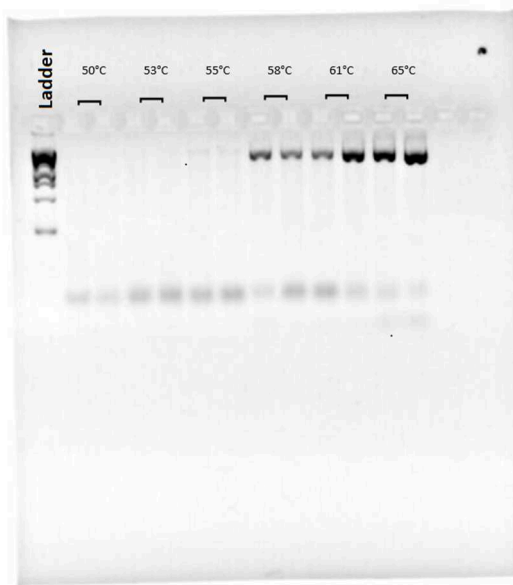
Pro kontrolu PCR amplikonů byla provedena agarová elektroforéza. Při agarové elektroforéze dochází k separaci molekul DNA podle jejich velikosti v elektrickém poli. Nukleové kyseliny nesou záporně nabitý náboj, a tudíž se pohybují od katody k anodě.

Gel jsme připravili rozpuštěním 0,5 g práškové agarózy v 25 ml pufru. Do pufru s práškem agarózy byl následně přidán 1 µl barviva (GelRed), který interkaluje s dvojšroubovicí DNA. Připravený roztok jsme nalili do elektroforetické vany a společně s tzv. hřebínkem, který byl vložen do roztoku pro vytvarování nanášecích jamek, proběhlo v elektroforetické vaně tuhnutí po dobu 30 minut. Po ztuhnutí agaru

byly napipetovány 4 μ l vzorku smíchané s 2 μ l roztoku nanášecí barvy do jednotlivých jamek v gelu. Do první jamky jsme nanesly 5 μ l velikostního standardu neboli tzv. ladderu (žebříčku), který umožní odečet velikostí PCR amplikonů v párech bazí. Připravený gel s nanesenými vzorky byl uzavřen do elektroforetické vany a připojen k elektrickému proudu s napětím 80 V. Po proběhnutí reakce byl samotný gel prosvícen UV světlem a výsledný obraz byl vyfocen a archivován.



Obrázek 8: PCR při publikované teplotě



Obrázek 9: PCR- gradient

7.3.4 *Přečištění PCR produktů pro sekvenační reakci*

PCR po amplifikaci byla přečištěna následujícím způsobem. Nejprve jsme stočili vzorek pro odstranění kondenzátu z víčka a promíchali ependorf mikrozkušavky se suspenzí paramagnetických kuliček Agencourt AMPure, tak aby směs měla homogenní barvu, jelikož kuličky snadno sedimentují. Takto rozmíchané kuličky (36 μ l) jsme přidali k PCR produktu (20 μ l) a tuto směs opět zvortexovali. Po inkubaci 3-5 minut při pokojové teplotě byla zkumavka s PCR produktem a kuličkami přemístěna do magnetického stojánku Agentcourt SPRIPlate 96R na 5-10 minut, dokud nedošlo k vyčerení roztoku (paramagnetické kuličky jsou z roztoku přitaženy magnetem). Následně byl opatrně odsát supernatant, tak aby nedošlo k poškození vytvořeného

kroužku z paramagnetických částic, na kterých je navázaná DNA PCR amplikonů. Ke vzorku, který je stále umístěn na destičce bylo přidáno 200 μl čerstvě připraveného 75 % etanolu, který je po 30 vteřinách bezzbytku odsát. Přidání alkoholu a jeho následné odsátí je znovu opakováno a slouží k odmytí nevyužitých nukleotidů a dalších složek reakční směsi z PCR reakce. Následuje inkubace 10-20 minut při pokojové teplotě tak, aby se případný zbytkový alkohol odpařil. Nemělo by, však dojít k přeschnutí, které se projeví rozpraskáním kroužku magnetických částic. Po této inkubaci je vzorek sundán z magnetického stojánku a ke vzorku je přidána 40 μl ultračisté vody a směs kuliček s vodou je důkladně propitována, tím dojde k uvolnění DNA do roztoku.

Tabulka 8: Pipetovací postup pro přečištění PCR produktů

PCR amplifikace	20 μl
Agentcourt AMPure	36 μl
75% etanol	200 μl
H ₂ O	40 μl

7.4 Sangerovo sekvenování – obecný princip

Sangerovo sekvenování je metoda vhodná pro analýzu krátkých specifických oblastí genomu. Analýza probíhá za přítomnosti templátové DNA, sekvenčních primerů, polymerázové DNA a čtyř deoxynukleotidtrifosfátů (dNTPs) a dideoxynukleotidtrifosfátů (ddNTPs). Tyto ddNTPs jsou označeny čtyřmi různými fluorescenčními barvičkami. Syntetizovaný řetězec DNA se prodlužuje, dokud nedojde k začlenění dostupného ddNTP, čímž se další prodlužování ukončí. Po syntéze jsou reakční produkty separovány podle velikosti v kapiláře sekvenátoru. Při průchodu detektorem je kapilára excitována laserem a detektor detekuje konkrétní fluorescenční barvičku podle které je rozeznána nukleotidová báze. Výsledkem je chromatogram (Janitz, 2008).

7.4.1 Sekvenační reakce

Následným krokem po přečištění produktů PCR byla sekvenační reakce. Reakční směs pro sekvenační reakci je připravena separátně pro každý primer, protože sekvenujeme

vždy jedno vlákno DNA ve směru forward nebo reverse. Reakční směs se připravuje podle pipetovacího protokolu uvedeného v tabulce 9. Každá zkumavka tedy obsahovala 10 µl celkového objemu.

Zkumavka s takto připravenou reakční směsí je umístěna do termocycleru, kde proběhne teplotní protokol: uvedený v tabulce č. 10.

Tabulka 9: Pipetovací postup pro sekvenační reakci

PCR produkt	2,0 µl
BigDye Terminator	0,5 µl
Seq. Buffer	1,75 µl
Seq. Primer	2,5 µl
H ₂ O	3,25 µl

Tabulka 10: Teplotní protokol pro sekvenační reakci

96 °C	3 min	
96 °C	10 sec	30 cyklů
50 °C	5 sec	
60 °C	2 min	
10 °C	Hold	

7.4.2 *Přečištění po sekvenační reakci*

Po vyjmutí z termocycleru jsou zkumavky krátce stočeny pro odstranění kondenzátu z víčka. Před přidáním paramagnetických kuliček AgenCourtSEQ, jejich zásobní roztok důkladně promícháme vortexováním. Do zkumavky s reakční směsí po sekvenační reakci bylo napipetováno 10 µl rozmýchaných paramagnetických kuliček AgenCourtSEQ. Následně je přidáno 42 µl čerstvě připraveného 85 % etanolu a směs je promíchána pipetováním cca 30 vteřin. Vzorek je poté umístěn do magnetického stojánku Agentcourt SPRIPlate 96R na přibližně 3 minuty, dokud nedojde k vyčerení roztoku, kuličky s DNA jsou přitaženy magnetem na kraj zkumavky. Supernatant je optárně odsát, tak aby nedošlo k poškození kroužku kuliček na stěně zkumavky. Následují dva promývací kroky se 100 µl čerstvě připraveného 85 % etanolu a 30 vteřinovou inkubací

při pokojové teplotě a odsátí supernatantu. Vzorek se poté nechá schnout 10 minut, tak aby nedošlo k přeschnutí kuliček s navázanou DNA. Posledním krokem je přidání 80 μ l destilované vody, a propitování roztoku.

7.4.3 *Sangerovo sekvenování*

Vlastní sekvenování proběhlo na sekvenátoru Applied Biosystems 3130xl. Kvalita sekvencí byla zkontrolována v prohlížeči FinchTV. Jednotlivé sekvence byly poté namapovány na referenční sekvenci *N. gonorrhoeae*. V případě genů *penA*, *mtrR*, *ponA*, *porB*, *23S rRNA*, *gyrA* jsme po namapování získaných sekvencí na referenční genom zjistili nedostatečné pokrytí některých úseků. Z tohoto důvodu byly nejprve použity již dostupné primery pro PCR s HRM. Pro stále nepokrytá místa byly navrženy další sekvenační primery, abychom pokryli i tyto úseky. Pro mapování sekvencí a návrh sekvenačních primerů byl použit software Genneious (příloha č.1).

8 Výsledky

8.1 Celogenomové sekvenování

Po namapování krátkých sekvencí (150 pb) na referenční genomy *N. gonorrhoeae*, *U. urealiticism*, *C. trachomatis* pomocí softwaru Geneious bylo zjištěno téměř nulové pokrytí referenčních genomů. Toto mohlo být způsobeno zřejmě vysokým podílem humánní (kontaminující) DNA. Z tohoto důvodu jsme se pokusili o úpravu vzorku (odstranění DNA, viz kapitola 7.2.3) před přípravou nové knihovny pro WGS.

Zastoupení humánní a bakteriální DNA u vzorků před úpravou a po úpravě je uvedeno v tabulce 11. U tří vzorků byl zjištěn výrazný pokles zastoupení humánní DNA. Bohužel, s poklesem zastoupení humánní DNA ve vzorku můžeme také vidět i pokles koncentrace detekovaného patogena. Vzorky, u kterých byl pokles humánní DNA dostatečný, byly osekvenovány (WGS). Jednalo se o tři vzorky uvedené v tabulce 11 (2287, 2275, 2243), sekvenace u vzorku 2304 nebyla provedena z důvodu nedostatečného odstranění humánní DNA. Po osekvenování byly krátké sekvence opět namapovány na referenční genomy s bohužel shodným téměř nulovým pokrytím.

Tabulka 11: Zastoupení humánní a bakteriální DNA (kopie) v jednotlivých vzorcích před a po úpravě pomocí Saponinu a TritonuX-100

	Vzorek	<i>N. gonorrhoeae</i>	Chlamydia	LGV	<i>U. parvum</i>	Lidská DNA
Moč	2304	15 088 731				3 406 122
	2304T	9 360 659				4 992 454
Moč	2287	11 110 673				1 690 137
	2287T	13 278				477
Moč	2275				142 233	201 292
	2275T				461	1 798
Výtěr	2243		1273543	2689		32 396 273
	2243T		1098507	5693		7 100 720

8.2 PCR s HRM analýzou

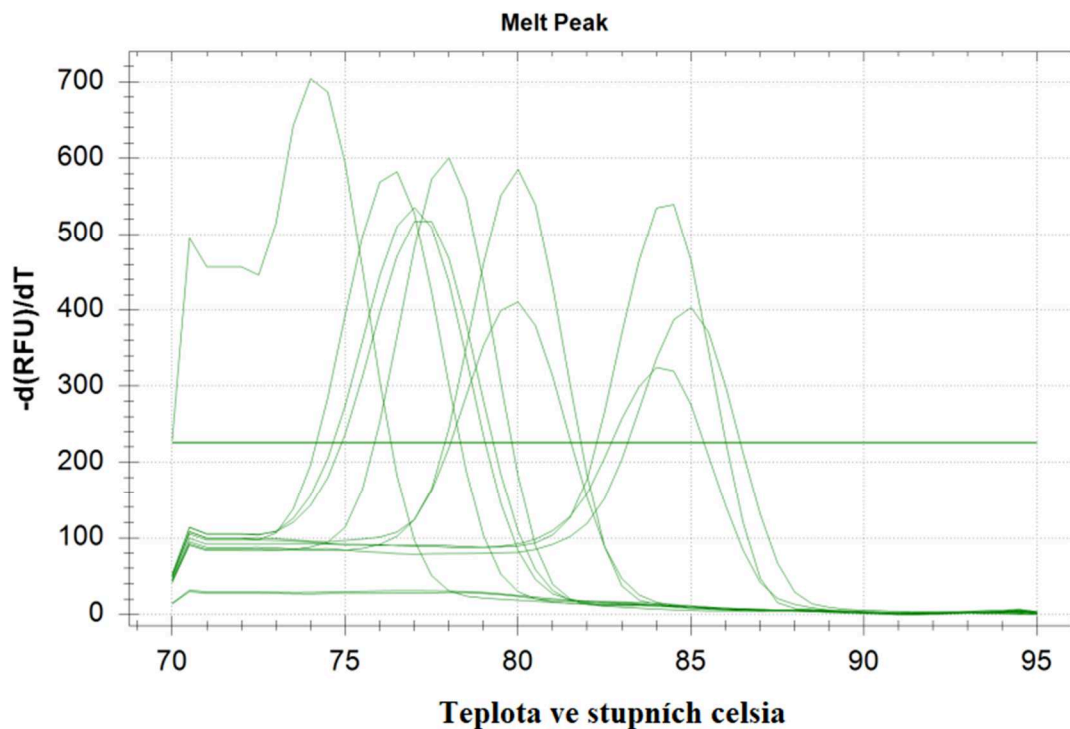
V průběhu řešení této práce byla provedena PCR s HRM analýzou. Tato metoda je prozatím optimalizována pro monoplexové uspořádání, kdy každý gen je amplifikován samostatně.

Výsledky můžeme vidět na obrázku 10. V grafu získaného z analyzátoru je znázorněna změna jednotek relativní fluorescence (RFU) s časem [dRFU/dT] v závislosti na teplotě ve stupních celsia. Jak již bylo zmíněno, PCR amplifikace byla provedena v monoplexu, takže každá křivka odpovídá jednomu amplifikonu. Jednotlivé detekované teploty tání jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Pro rutinní použití bude metoda optimalizována jako multiplexové PCR, z důvodu úspory chemie. Nejdříve je však nutné získat vzorky s již známými molekulárními mechanismy resistance, tak aby bylo možné analyzovat posuny v křivkách tání mezi vzorky s mutací a bez mutace.

Tabulka 12: Tabulka znázorňující výsledné teploty tání pro jeden vzorek analyzovaný v monoplexu (1 pár primerů pro následující geny *mtrR*, *23S rRNA*, *ponA*, *penA*, *porB*)

Jamka	Fluor	Použité primery	Vzorek	Teplota tání
A01	SYBR	335+336	4110	77,60
A02	SYBR	351+352	4110	78,10
B01	SYBR	337+338	4110	81,50
B02	SYBR	353+354	4110	80,20
C01	SYBR	339+340	4110	85,00
C02	SYBR	355+356	4110	85,00
D01	SYBR	341+342	4110	74,30
E01	SYBR	343+344	4110	None
F01	SYBR	345+346	4110	79,90
G01	SYBR	347+348	4110	85,30
H01	SYBR	349+350	4110	76,70



Obrázek 10: graf křivky tání pro jeden vzorek analyzovaný v monoplexu (1 pár primerů pro následující geny *mtrR*, *23S rRNA*, *ponA*, *penA*, *porB*)

8.3 Cílově specifická PCR pro následné sekvenování

V rámci zpracování dat proběhla optimalizace PCR protokolu pro amplifikaci jednotlivých genů, u kterých jsme zjišťovali optimální teploty pro nasedání primerů. Toho bylo docíleno pomocí gradientové PCR s detekcí PCR amplikonů agarovou elektroforézou. Optimální anealingové teploty pro jednotlivé geny jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Tabulka 13: Získané optimální anealingové teploty pro cílově specifickou PCR

Gen	Optimální teplota (°C)
<i>penA</i>	61
<i>ponA</i>	64
<i>porB</i>	61
<i>mtrR</i>	64
<i>23S rRNA</i>	61
<i>gyrA</i>	61

Vzhledem k nedostatečnému pokrytí analyzovaných úseků DNA byly v průběhu experimentální části předkládané práce navrženy nové primery. Pomocí některých primerů z PCR s HRM a těchto nově navržených primerů, jsme dosáhli pokrytí požadovaných úseků genomu.

Tabulka 14: Nově navržené primery

Cílový gen	č. primeru	Primer	Oligonukleotid
<i>penA</i>	378	Sek_penA	5'-ACCGATGCCCAATTCATGAT-3'
<i>mtrR</i>	379	Sek_mtrR	5'-GGTTTGATGTAAAGGGTTTGGCC-3'
<i>mtrR</i>	380	Sek_mtrR	5'-CGAAAACGCCATTATGAGAAAAACC-3'
<i>ponA</i>	381	Sek_ponA	5'-CCTTGGGTTTGGCGGCC-3'

Tabulka 15: Kombinace primerů pro sekvenční reakce potřebné k pokrytí jednotlivých genů

Geny	Sekvenční primery
<i>penA</i>	357+358+378
<i>mtrR</i>	359+379+380
<i>ponA</i>	361+362+381
<i>porB</i>	363+335
23S <i>rRNA</i>	365+366
<i>gyrA</i>	363+367+368

9 Diskuze

Bakterie *Neisseria gonorrhoeae*, která způsobuje kapavku a její nesnadnou léčbu v oblasti antimikrobiální rezistence, představuje hlavní problém veřejného zdraví na celém světě. V mnoha zemích byla doporučována antimikrobiální terapie v kombinaci dvou a více ATB, o kterých se uvádělo, že zvyšují účinnost léčby. Avšak v současné době bylo již zaznamenáno terapeutické selhání i u této kombinované léčby. Antimikrobiální rezistence gonokokových kmenů a její globální šíření, bývají spojené převážně s cestováním do cizích zemí za tzv. sexuální turistikou (Unemo et al., 2019). Rostoucí antimikrobiální rezistence je hrozbou pro moderní medicínu a rostoucí mezinárodní mobilita usnadňuje její šíření. Infekce rezistentními organismy mají vyšší morbiditu a úmrtnost, jsou nákladnější na léčbu, vedou k delšímu pobytu v nemocnici a představují větší zátěž pro zdravotní systémy (Frost et al., 2019).

Situaci stěžuje i obtížnost nebo i nemožnost kultivace, kterou se někteří původci STD vyznačují. Pro kultivační záchyt je nutný důkladný odběr, rychlý transport materiálu a mnohdy speciální kultivační média a podmínky. Některé infekce také mohou probíhat asymptomaticky (obzvláště u mužů) což představuje riziko dalšího šíření a možných zdravotních komplikací spojených s reprodukcí. Z výše uvedených důvodů je v současné době pro diagnostiku sexuálně přenosných infekcí využívána molekulární diagnostika. Výsledky zajišťují vyšší citlivost a kvalitu ve srovnání s bakteriální kulturou (Verma a Sood, 2016), ale jako vedlejší efekt nám chybí údaje o antibiotické citlivosti původců STD.

Výše uvedené důvody vedly k tématu této práce, kdy jsme se pokusili o zavedení metody pro molekulární detekci již popsaných mechanismů rezistence u původců STD, přímo z klinického materiálu pozitivního pomocí komerčního multiplexového PCR bez kultivační pozitivivity *N. gonorrhoeae*.

Z hlediska možnosti detekce všech již popsaných mechanismů rezistence a zjištění nových potenciálních mechanismů by byla nejvýhodnější metoda celogenomového sekvenování. Ta byla již popsána v několika pracích, ale autoři vždy používali již kultivované kmeny *N. gonorrhoea* (Xiu et al., 2020, Eyre et al., 2019, Fifer et al., 2020). V naší práci jsme použili DNA, která byla použita pro primární PCR detekci původců STD, bohužel ačkoliv příprava knihovny proběhla standardně, po namapování získaných sekvencí na referenční genomy jsme získali téměř nulové pokrytí, takže naše

knihovna byla silně kontaminována průvodní humánní DNA. Tato DNA tedy byla sekvenována preferenčně před DNA fragmenty genomu patogena, které byly ve vzorku zastoupeny v nižším počtu.

Vzhledem k těmto výsledkům jsme provedli odstranění humánní DNA pomocí přečištění zajištěného působením saponinu a tritonu-X. Ačkoliv podle výsledků zastoupení bakteriální a humánní DNA, došlo k výrazné redukci humánní DNA, po namapování sekvencí na referenční genomy bylo výsledné pokrytí konkrétních genů (*penA*, *mtrR*, *ponA*, *porB*, *23S rRNA*, *gyrA*) *N. gonorrhoeae* nedostatečné pro analýzu bodových mutací, či jiných genetických změn. Z důvodu nevhodnosti WGS byla dále použita cílově specifická PCR s analýzou křivek tání (HRM). Primery pro tuto metodu byly převzaty z publikací Donà et al., 2016 (gen *gyrA*) a Xiu et al., 2020 (geny *penA*, *mtrR*, *ponA*, *porB*, *23S rRNA*). Použitím těchto primerů v monoplexovém uspořádání jsme spolehlivě amplifikovali všechny cíle. Pro klinické použití je nutné získat vzorky se známým mechanismem rezistence, abychom mohli evaluaovat spolehlivost detekce jednotlivých mechanismů na základě změny v teplotě tání PCR ampliconů.

Pro získání výše uvedených vzorků se známým mechanismem rezistence jsme v experimentální části práce zavedli a optimalizovali cílově specifické PCR pro Sangerovo sekvenování jednotlivých genů asociované s rezistencí k antibiotikům volby. Tento přístup je sice laboratorně i finančně náročný, ale jedná se o nezbytný krok k získání souboru vzorků potřebných pro evaluaci, popřípadě optimalizaci výše uvedené specifické PCR s HRM. Také sekvenováním jednotlivých genů mohou být objeveny doposud nepopsané mutace. Stejně jako v případě PCR s HRM jsme i pro sekvenování jednotlivých genů použili již publikované primery z publikace Zhang et al., 2021. Pro získání vhodných PCR ampliconů bylo nutné optimalizování teplotního protokolu pro jednotlivé geny, protože při použití teploty publikované autory (Zhang et al., 2021) nebyla PCR amplifikace úspěšná. To může být způsobeno použitím jiné polymerázy nebo odlišnou syntézou primerů. Další optimalizaci vyžadovalo vlastní sekvenování. Po namapování získaných sekvencí jsme u některých genů nedosáhli pokrytí celé oblasti, která měla být analyzována. Zkusili jsme tedy použít primery z PCR s HRM a u oblastí, které byly stejně nepokryty, jsme navrhli dodatečné sekvenační primery. Ve studii Zhang et al., 2021 byl pro sekvenování PCR ampliconů použit sekvenátor MinION. Tento přenosný sekvenátor patří mezi sekvenátory nové generace. Tato konkrétní technologie umožňuje sekvenování dlouhých fragmentů. V naší práci byl použit

sekvenátor první generace, který má sekvenační schopnost do maximálně 660 pb v jednom směru. Vzhledem k odlišnosti použitých sekvenátorů bylo nutné navrhnout další primery pro sekvenaci, aby byl analyzovaný úsek zcela pokrytý.

10 Závěr

V rámci mé bakalářské práce byly vyzkoušeny různé postupy pro molekulární detekci mechanismů antimikrobiální rezistence u původců sexuálně přenosných infekcí. Nejvýhodnějším způsobem by bylo celogenomové sekvenování, ale u této metody jsme narazili na problém vysoké kontaminace průvodní humánní DNA ve vzorku. Pro další použití této metody je tedy nutné zoptimalizovat izolaci DNA, kdy by bakteriální DNA byla obohacena a humánní DNA depletována. Dalším přístupem byla PCR s HRM pro detekci již popsanych mechanismů rezistence u *N. gonorrhoeae*. Jedná se o levnou a rychlou metodu, avšak pro její případné použití v klinické praxi je nutné shromáždit vzorky se známým mechanismem rezistence, abychom mohli evaluaovat spolehlivost detekce jednotlivých mechanismů na základě změny v teplotě tání PCR amplikonů. Pro získání výše uvedených vzorků se známým mechanismem rezistence jsme v experimentální části práce zavedli a optimalizovali cílově specifické PCR pro Sangerovo sekvenování jednotlivých genů asociované s rezistencí k antibiotikům volby.

Proto by tato bakalářská práce mohla být přínosem nejen pro laickou veřejnost, ale dále posloužit jako podklad pro podrobnější a důkladnější výzkum v této oblasti, jelikož s nárůstem antimikrobiální rezistence hrozí, že se běžné infekce stanou nevléčitelnými i dokonce až smrtelnými.

11 Seznam literatury

AHMED, J., RAWRE, J., DHAWAN, N., KHANNA, N., DHAWAN, B., 2021. *Mycoplasma hominis*: An under recognized pathogen. 39(1), 88-97 DOI: 10.1016/j.ijmmb.2020.10.020.

AYALA, J.C. et al., 2022. Gonococcal Clinical Strains Bearing a Common *gdhR* Single Nucleotide Polymorphism That Results in Enhanced Expression of the Virulence Gene *igtP* Frequently Possess a *mtrR* Promoter Mutation That Decreases Antibiotic Susceptibility. 13(2), e00276-22 DOI: 10.1128/mbio.00276-22.

BALLOUX, F. et al., 2018. From Theory to Practice: Translating Whole-Genome Sequencing (WGS) into the Clinic. 26(12), 1035-1048 DOI: 10.1016/j.tim.2018.08.004.

BARBOUR, A.G., 1981. Properties of penicillin-binding proteins in *Neisseria gonorrhoeae*. 19(2), 316-322 DOI: 10.1128/AAC.19.2.316.

BENEŠ, J., 2009. *Infekční lékařství*. Praha: Galén. 651 s. ISBN 978-807-2626-441 6.

BENEŠ, Jiří, 2018. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0636-3.

BENNETT, J.E., DOLIN, R., BLASER, M.J., 2014. *Mandell, Douglas, and Bennett Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier [online]. 2014, (1-2), 1-3697 ISBN: 9780323550277.

BLAIR, J.M.A., RICHMOND, G.E., PIDDOCK, L.J.V., 2014. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. 9(10), 1165-1177 DOI: 10.2217/fmb.14.66.

BODOEV, I.N., IL'INA, E.N., 2015. Molecular mechanisms of formation of drug resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: History and prospects. 30(3), 132-140 DOI: 10.3103/S0891416815030027.

C REYGAERT, W., 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. 4(3), 482-501. DOI: 10.3934/microbiol.2018.3.482.

- CARUSO, G., GIAMMANCO, A., VIRRUSO, R., FASCIANA, T., 2021. Current and Future Trends in the Laboratory Diagnosis of Sexually Transmitted Infections. 18(3), 1038. DOI: 10.3390/ijerph18031038.
- CRAWFORD, G. et al., 2016. HIV, Other Blood-Borne Viruses and Sexually Transmitted Infections amongst Expatriates and Travellers to Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review. 13(12), 1249 DOI: 10.3390/ijerph13121249.
- DONÀ, V. et al., 2016. Multiplex Real-Time PCR Assay with High-Resolution Melting Analysis for Characterization of Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. 54(8), 2074-2081. DOI: 10.1128/JCM.03354-15.
- DONATI, M. et al., 2016. Tetracycline Susceptibility in Chlamydia suis Pig Isolates. 11(2), e0149914 DOI: 10.1371/journal.pone.0149914.
- DRLICA, K., 1999. Mechanism of fluoroquinolone action. 2(5), 504-508 DOI: 10.1016/S1369-5274(99)00008-9.
- DRNKOVÁ, B., 2019. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0693-6.
- EYRE, D.W. et al., 2019. Euro Surveill: Detection in the United Kingdom of the *Neisseria gonorrhoeae* FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, October to December 2018. 24(10), 1-6 DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.10.1900147.
- FIFER, H., HUGHES, G., WHILEY, D., LAHRA, M. M., 2020. Lessons learnt from ceftriaxone-resistant gonorrhoea in the UK and Australia. 20(3), 276-278 DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30055-4.
- FONG, W., ROCKETT, R., TIMMS, V., SINTCHENKO, V., 2020. Optimization of sample preparation for culture-independent sequencing of *Bordetella pertussis*. 6(3), 332. DOI: 10.1099/mgen.0.000332.
- FOURNIER, P.-E. et al., 2013. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. 11(8), 574-585. DOI: 10.1038/nrmicro3068.
- FRICKE, W.F., RASKO, D.A., 2014. Bacterial genome sequencing in the clinic: bioinformatic challenges and solutions. 15(1), 49-55 DOI: 10.1038/nrg3624.

- FROST, I., VAN BOECKEL, T.P., PIRES, J., CRAIG, J., LAXMINARAYAN, R., 2019. Global geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. 26(8), 36 DOI: 10.1093/jtm/taz036.
- GOMES, C., RUIZ-ROLDÁN, L., MATEU, J., OCHOA, T.J., RUIZ, J., 2019. Azithromycin resistance levels and mechanisms in *Escherichia coli*. 9(1), 6089 DOI: 10.1038/s41598-019-42423-3.
- GREEN, M.R., SAMBROOK, J., 2018. Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data. 2018(10) DOI: 10.1101/pdb.top095000.
- HANDING, J.W., RAGLAND, S.A., BHARATHAN, U.V., CRISS, A.K., 2018. The MtrCDE Efflux Pump Contributes to Survival of *Neisseria gonorrhoeae* From Human Neutrophils and Their Antimicrobial Components. 9, 1-35 DOI: 10.3389/fmicb.2018.02688.
- HICKS, L.A. et al., 2011. US Outpatient Antibiotic Prescribing Variation According to Geography, Patient Population, and Provider Specialty in 2011. 60(9), 1308-16 DOI: 10.1093/cid/civ076.
- HOROVÁ, N., 2018. Chlamydiové infekce, jejich laboratorní diagnostika a pohled na účinná antibiotika k léčbě. (9), 18-22. ISSN 1213–8711.
- HUEMER, M., MAIRPADY SHAMBAT, S., BRUGGER, S.D., ZINKERNAGEL, A.S., 2020. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. 21(12), e51034 DOI: 10.15252/embr.202051034.
- HUGHES, G., SAUNDERS, J., 2018. *Mycoplasma genitalium*: the next sexually transmitted superbug? 363, 4376 DOI: 10.1136/bmj.k4376.
- HURYCH, J., ŠTÍCHA, R., 2021. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. 3. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-976-.
- JANITZ, M., ed., 2008. *Next Generation Genome Sequencing*. ISBN 9783527320905.
- KATHURIA, S. et al., 2015. Multidrug-Resistant *Candida auris* Misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal

Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method. 53(6), 1823-1830 DOI: 10.1128/JCM.00367-15.

KIM, N., KWON, J.-S., KANG, W.-H., YEOM, S.-I., 2023. High-Resolution Melting (HRM) Genotyping. In: SHAVRUKOV, Y., New York, NY: Springer US, 2023-02-14, s. 337-349 Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-0716-3024-2_24.

KOKKAYIL, P., DHAWAN, B., 2015. Ureaplasma: Current perspectives. 33(2), 205-214 DOI: 10.4103/0255-0857.154850.

KRALIK, P., RICCHI, M., 2017. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. 8, 1-9 DOI: 10.3389/fmicb.2017.00108 .

KUKLOVÁ, I., KOJANOVÁ, M., SLOVÁČKOVÁ, M., 2015. Sexuálně přenosné infekce a nárůst rezistence *Neisseria gonorrhoeae* k antimikrobiálním látkám. *Urologie pro praxi*: 16(4), 159-161.

L. NAGPAL, M., BOLDURA, O.-M., BALTĂ, C., ENANY, S., ed., 2020. Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science. ISBN 978-1-78984-089-6.

LEE, S.-G. et al., 2010. Various penA mutations together with mtrR, porB and ponA mutations in *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime or ceftriaxone. 65(4), 669-675 DOI: 10.1093/jac/dkp505.

LEVINE, C., HIASA, H., MARIANS, K.J., 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. 1400(1-3), 29-43 DOI: 10.1016/S0167-4781(98)00126-2.

LORENZ, T., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. (63):e3998 DOI: 10.3791/3998.

LOSSICK, J.G., KENT, H.L., 1991. Trichomoniasis: Trends in diagnosis and management. 165(4), 1217-1222 DOI: 10.1016/S0002-9378(12)90730-9.

MAHEASWARI, R., KSHIRSAGAR, J.T., LAVANYA, N., 2016. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. (20), 128-135 DOI: 10.4103/0972-124X.176391.

MURRAY, G.L. et al., 2019. The parC mutation G248T (S83I), and concurrent gyrA mutations, are associated with moxifloxacin and sitafloxacin treatment failure for *Mycoplasma genitalium*. 221(6):1017-1024 DOI: 10.1093/infdis/jiz550.

O'CONNELL, C.M., FERONE, M.E., 2016. Chlamydia trachomatis Genital Infections. 3(9), 390-403 DOI: 10.15698/mic2016.09.525.

OHNISHI, M. et al., 2011. Is *Neisseria gonorrhoeae* Initiating a Future Era of Untreatable Gonorrhea?: Detailed Characterization of the First Strain with High-Level Resistance to Ceftriaxone. 55(7), 3538-3545. DOI: 10.1128/AAC.00325-11.

OLESKY, M., ZHAO, S., ROSENBERG, R.L., NICHOLAS, R.A., 2006. Porin-Mediated Antibiotic Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Ion, Solute, and Antibiotic Permeation through PIB Proteins with penB Mutations. 188(7), 2300-2308 DOI: 10.1128/JB.188.7.2300-2308.2006.

PEREYRE, S., CAMÉLÉNA, F., HÉNIN, N., BERÇOT, B., BÉBÉAR, C., 2022. Clinical performance of four multiplex real-time PCR kits detecting urogenital and sexually transmitted pathogens. 28(5) DOI: 10.1016/j.cmi.2021.09.028.

ROPP, P.A., HU, M., OLESKY, M., NICHOLAS, R.A., 2002. Mutations in ponA , the Gene Encoding Penicillin-Binding Protein 1, and a Novel Locus, penC , Are Required for High-Level Chromosomally. 46(3), 769-777 DOI: 10.1128/AAC.46.3.769-777.2002.

ROWLEY, J. et al., 2019. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. 97(8), 548-562 DOI: 10.2471/BLT.18.228486.

ROZSYPAL, H., 2015. *Základy infekčního lékařství*. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2932-2.

ROZSYPAL, H., HOLUB, M., KOSÁKOVÁ, M., 2013. *Infekční nemoci ve standardní a intenzivní péči*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2197-5.

SAIKI, R.K. et al., 1985. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. 230(4732), 1350-1354, DOI: 10.1126/science.2999980.

SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopln. a přeprac. vyd.* Praha: Grada, 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.

STANLEY, K.K., SZEWCZUK, E., 2005 Nov 24. Multiplexed tandem PCR: gene profiling from small amounts of RNA using SYBR Green detection 33(20), 180 DOI: 10.1093/nar/gni182.

SVENSSON, P. et al., 2018. A meta-analysis and systematic literature review of factors associated with sexual risk-taking during international travel. 24(24), 65-88 DOI: 10.1016/j.tmaid.2018.03.002.

THOMAS, J.C. et al., 2019. Evidence of Recent Genomic Evolution in Gonococcal Strains With Decreased Susceptibility to Cephalosporins or Azithromycin in the United States, 2014–2016. 220(2), 294-305 DOI: 10.1093/infdis/jiz079.

TIEN, V., PUNJABI, C., HOLUBAR, M.K., 2020. Antimicrobial resistance in sexually transmitted infections. 27(1), 101 DOI: 10.1093/jtm/taz101.

TOMBERG, J. et al., 2017. Alanine 501 Mutations in Penicillin-Binding Protein 2 from *Neisseria gonorrhoeae*: Structure, Mechanism, and Effects on Cephalosporin Resistance and Biological Fitness. 56(8), 1140-1150 DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01030.

UNEMO, M. et al., 2016. The novel 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: phenotypic, genetic and reference genome characterization. 71(11), 3096-3108. DOI: 10.1093/jac/dkw288.

UNEMO, M. et al., 2017. Sexually transmitted infections: challenges ahead. 17(8), 235-279 DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30310-9.

UNEMO, M. et al., 2019. World Health Organization Global Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program (WHO GASP): review of new data and evidence to inform international collaborative actions and research efforts. 16(5), 412-425 DOI: 10.1071/SH19023.

UNEMO, M., JENSEN, J.S., 2017. Antimicrobial-resistant sexually transmitted infections: gonorrhoea and *Mycoplasma genitalium*. 14(3), 139-152 DOI: 10.1038/nrurol.2016.268.

URBÁŠKOVÁ, P., HRABÁK, J., 2012. *Medical Tribune: Antibiotická rezistence bakterií.*

VERMA, R., SOOD, S., 2016. Gonorrhoea diagnostics: An update. 34(2), 139-145. DOI: 10.4103/0255-0857.180278.

WAN, C. et al., 2018. Increasing Resistance to Azithromycin in *Neisseria gonorrhoeae* in Eastern Chinese Cities: Resistance Mechanisms and Genetic Diversity among Isolates from Nanjing. 62(5), e02499-17 DOI: 10.1128/AAC.02499-17.

WARNER, D.M., SHAFER, W.M., JERSE, A.E., 2008. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE Efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness. 70(2), 462-478 DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06424.x.

WARREN, H., 2020. Non-specific urethritis and mycoplasma genitalium. Trends in Urology & Men's Health. 11(4), 15-17 DOI: 10.1002/tre.759.

WATERS, D.L.E., SHAPTER, F.M., 2014. The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods. 2014-10-31, s. 65-75 DOI: 10.1007/978-1-62703-715-0_7.

XIU, L. et al., 2020. Multiplex High-Resolution Melting Assay for Simultaneous Identification of Molecular Markers Associated with Extended-Spectrum Cephalosporins and Azithromycin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. 22(11), 1344-1355 DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.08.003.

YUEYUE, W. et al., 2022. Pathogenicity and virulence of *Mycoplasma genitalium*: Unraveling Ariadne's Thread. 13(1), 1161-1183 DOI: 10.1080/21505594.2022.2095741.

ZÁHUMENSKÝ, J., JILICH, D., VAŇOUSOVÁ, D., [2015]. *Základy moderní venerologie: učebnice pro mezioborové postgraduální vzdělávání.* Praha: Maxdorf, 179 s. Jessenius. ISBN 978-80-7345-429-6.

ZÁKOUCKÁ, H., 2020. Sexually transmitted infections: a modern approach to diagnosis. 14(1), 10-16 DOI: 10.36290/der.2020.006.

ZAPUN, A., MORLOT, C., TAHA, M.-K., 2016. Resistance to β -Lactams in *Neisseria* ssp Due to Chromosomally Encoded Penicillin-Binding Proteins. 5(4), 35 DOI: 10.3390/antibiotics5040035.

ZHAO, S. et al., 2009. Genetics of Chromosomally Mediated Intermediate Resistance to Ceftriaxone and Cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. 53(9), 3744-3751 DOI: 10.1128/AAC.00304-09.

ŽEMLIČKOVÁ, H., 2019. *Praktikum lékařské mikrobiologie*. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 54 s. ISBN 978-80-246-4378-6.

Internetové zdroje:

C.D.C., 2007. *Update to CDC's Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines*, 56(14), 332-336 [online]. 2007 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5614a3.htm>

EliGene® *Neisseria* UNI 90047-UNI (for 50 samples). In:EliGene [online]. 2020 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://www.eligene.com/sexually-transmitted-urinal-infections.html>

GeneProof CT/NG/MG Multiplex PCR Kit. In:GeneProof [online]. 2022 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://www.geneproof.com/geneproof-neisseria-gonorrhoeae-pcr-kit/p1069>

HUSSIEN, R., 2019. Management of *Ureaplasma*. PharmD Candidate 2019, UMKC [online]. In: Copyright 2020, Missouri Society of Health-System Pharmacists, (314), 416-2246 [cit. 2023-4-21]. Dostupné z: www.moshp.org

POLÁČKOVÁ, Z., 2008. Pohlavní Choroby – I. DÍL 2(2), 74–76 [online]. 2008 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/>

POLÁČKOVÁ, Z., 2016. Přehled pohlavně přenosných onemocnění. 17(3), 124–128 [online]. 2016 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/>

Sexually transmitted infections (STIs). In: World health organization [online]. 2022 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: https://www.who.int/health-topics/sexually-transmitted-infections#tab=tab_1

URINOGENITAL AND RESISTANCE (12-WELL) REF 27123 VER 05. In: AusDiagnostics [online]. 2019 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://www.ausdiagnostics.com/genital-infections-and-sti>

Vybrané infekční nemoci povinně hlášené 2021. In: Český statistický úřad [online]. [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/25-zdravotnictvi-pdjjd50qzi>

Zákon č. 327/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování (zákon o zdravotních službách), 2011 In: *Sbírka zákonů České republiky*, částka 114, s. 4730–4801. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2011-372>

Zdravotnická ročenka České republiky 2019. In: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR [online]. [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=record&id=8381>

National library of Medicine (NCBI) [online]. [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

12 Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled komerčních souprav určených pro molekulární diagnostiku STD	26
Tabulka 2: Primery použité při experimentech prováděných v rámci bakalářské práce	30
Tabulka 3: Primery použité při experimentech prováděných v rámci bakalářské práce	31
Tabulka 4: Chemikálie a kity použité při experimentech v rámci bakalářské práce.....	32
Tabulka 5: Pipetovací protokol pro PCR s HRM analýzou	36
Tabulka 6: Pipetovací protokol pro PCR amplifikaci jednoho vzorku	37
Tabulka 7: Amplifikační protokol pro PCR.....	37
Tabulka 8: Pipetovací postup pro přečištění PCR produktů	39
Tabulka 9: Pipetovací postup pro sekvenační reakci	40
Tabulka 10: Teplotní protokol pro sekvenační reakci.....	40
Tabulka 11: Zastoupení humánní a bakteriální DNA (kopie) v jednotlivých vzorcích před a po úpravě pomocí Saponinu a TritonuX-100.....	42
Tabulka 12: Tabulka znázorňující výsledné teploty tání pro jeden vzorek analyzovaný v monoplexu (1 pár primerů pro následující geny <i>mtrR</i> , <i>23S rRNA</i> , <i>ponA</i> , <i>penA</i> , <i>porB</i>)	43
Tabulka 13: Získané optimální anealingové teploty pro cílově specifickou PCR	44
Tabulka 14: Nově navržené primery	45
Tabulka 15: Kombinace primerů pro sekvenční reakce potřebné k pokrytí jednotlivých genů.....	45

13 Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	11
Obrázek 2: Kultivace <i>Neisseria gonorrhoeae</i> na čokoládovém agaru.....	11
Obrázek 3: <i>Chlamydia trachomatis</i>	17
Obrázek 4: <i>Mycoplasma genitalium</i>	18
Obrázek 5: <i>Mycoplasma hominis</i>	19
Obrázek 6: <i>Trichomonas vaginalis</i>	21
Obrázek 7: <i>Ureaplasma</i>	22
Obrázek 8: PCR při publikované teplotě.....	38
Obrázek 9: PCR- gradient	38
Obrázek 10: graf křivky tání pro jeden vzorek analyzovaný v monoplexu (1 pár primerů pro následující geny <i>mtrR</i> , <i>23S rRNA</i> , <i>ponA</i> , <i>penA</i> , <i>porB</i>)	44

14 Seznam příloh

Příloha 1: Namapování sekvencí (Sangerovo sekvenování) na referenční sekvenci (gen *ponA*)



15 Seznam zkratek

ATB – antibiotika

AZM – azitromycin

ddNTPs – dideoxyribonukleotidfosfáty

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTPs - deoxyribonukleotidtrifosfáty

dRFU/dT - relativní fluorescenční jednotka s časem v závislosti na teplotě

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (imunochemická analýza)

ESC – cefalosporiny

g – gram

H₂O - voda

HRM – tavení s vysokým rozlišením

LGV - Lymphogranuloma venereum (pohlavně přenosná infekce)

mg/l – miligram na litr

MIC – minimální inhibiční koncentrace

ml – mililitr

MT-PCR - multiplexní tandemová PCR

NG – *Neisseria gonorrhoea*

pb – petabajt

PBP1 – protein 1 vázající penicilin

PBP2 – protein 2 vázající penicilin

PCR – polymerázová řetězová reakce

RFU – relativní fluorescenční jednotka

RNA – ribonukleová kyselina

RT-PCR – PCR v reálném čase

STD – sexuálně přenosné infekce

UV – ultrafialové záření

V – volt

WGS – sekvenování celého genomu

WHO – Světová zdravotnická organizace

°C – stupeň Celsiův

μl – mikrolitr