

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Doktorská disertační práce

Olomouc 2016

Lucie Navrátilová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav mikrobiologie



**Identifikace a charakterizace bakterií pomocí
PCR s následnou analýzou tání**

Doktorská disertační práce

Olomouc 2016

RNDr. Lucie Navrátilová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou doktorskou disertační práci s názvem 'Identifikace a charakterizace bakterií pomocí PCR s následnou analýzou tání' vypracovala samostatně. Všechny prameny, ze kterých jsem čerpala při vypracovávání této práce, řádně cituji a uvádím úplný odkaz na příslušný zdroj.

V Olomouci dne

Podpis:.....

Poděkování

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

Děkuji rovněž doc. MUDr. Dagmar Koukalové, CSc. a prof. MUDr. Milanu Kolářovi, Ph.D. za poskytnutí zázemí pro provedení experimentální části mé disertační práce a rovněž svým kolegům, zejména Bc. Petře Procházkové, kteří svými připomínkami nebo pomocí přispěli k realizaci mé doktorské disertační práce.

Tato práce byla prováděna mj. s podporou grantu IGA MZ ČR (NT/13560), MŠMT (LO1304) a vnitřního grantu LF UP (LF_2015_035). Infrastrukturní část (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena operačním programem "Výzkum a vývoj pro inovace" (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Souhrn

Diagnostika mikrobiálních infekcí vyžaduje rychlé a přesné metody detekce a identifikace původce nákazy. Tyto metody jsou založeny buď na posouzení fenotypu, nebo genotypu daného mikroorganismu. Fenotypové metody sledují zejména fyziologické a biochemické vlastnosti, zatímco genotypové metody jsou založené na posouzení mezidruhových odlišností v sekvenci DNA.

Předložená práce shrnuje dostupné literární zdroje ve studované oblasti a zaměřuje se na zhodnocení možného přínosu PCR s následnou analýzou tání ve třech oblastech: (1) v identifikaci bakterií se zaměřením na nefermentující gramnegativní tyčinky, (2) v rozlišení genomovarů komplexu *Burkholderia cepacia* a (3) v identifikaci druhů skupiny *Streptococcus milleri* (*S. anginosus*, *S. constellatus* a *S. intermedius*). Tyto skupiny bakterií jsme vybrali, protože se jedná o patogeny významně přispívající k plicním exacerbacím u pacientů s cystickou fibrózou.

Do studie bylo zařazeno 1140 klinických izolátů, které byly vykultivovány ze 402 vzorků získaných od 126 pacientů trpících bronchiektáziemi, cystickou fibrózou nebo chronickou obstrukční plicní nemocí, kteří byli v péči Kliniky plicních nemocí a tuberkulózy a Dětské kliniky Fakultní nemocnice Olomouc.

První část práce se zabývala identifikací bakterií, hlavně gramnegativních nefermentujících tyčinek, pomocí (1) fenotypových metod, zahrnujících konvenční fenotypové metody a také MALDI-TOF MS a (2) genotypových metod, které byly zaměřeny na analýzu 16S rDNA, konkrétně hypervariabilní oblasti V1 16S rDNA genu, zastoupené PCR s následnou analýzou tání PCR produktu (PCR-HRMA) a pyrosekvencováním.

Druhá část práce se zabývala určením genomovarů komplexu *Burkholderia cepacia*, konkrétně genomovarů I až V, neboli *B. cepacia* sensu stricto, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis* a *B. vietnamiensis*, které se celosvětově ze zmíněného komplexu vyskytují nejčastěji jako oportunní lidské patogeny. Pro určení genomovaru byla jako zlatý standard použita PCR analýza genu *rec*. Byla testována vypovídací schopnost (1) konvenčních fenotypových metod, (2) genomovar-specifické PCR s následnou analýzou křivky tání PCR produktů, (3) pyrosekvencování a (4) MALDI-TOF MS. V rámci této části bylo analyzováno 28 klinických izolátů identifikovaných jako komplex *Burkholderia cepacia*. Konvenční fenotypové metody podle očekávání rozlišení genomovarů neumožnily a pyrosekvencování variabilní oblasti V1 16S rDNA také ne. Zbylé aplikované metody, tj. PCR-HRMA analýza genu *recA* a MALDI-TOF MS, rozlišení genomovarů umožnily.

Třetí část studie se zabývala identifikací druhů skupiny *Streptococcus milleri* (*Streptococcus milleri* group, SMG). Pro záchyt SMG byla použita semi-selektivní půda McKay agar. Pro rozlišení druhů skupiny *Streptococcus milleri* byla použita real-time PCR a nested PCR. V obou případech byly PCR produkty podrobeny analýze tání. Techniky byly testovány na 40 izolátech bakterií skupiny *Streptococcus milleri*.

Klíčová slova:

identifikace bakterií, PCR, analýza tání, pyrosekvencování, MALDI-TOF MS, komplex *Burkholderia cepacia*, skupina *Streptococcus milleri*

Summary

Diagnostics of bacterial infections requires rapid and accurate detection and species identification of the infectious agent. Species identification techniques are based either on an assessment of the phenotype or genotype of the microorganism. Phenotypic techniques examine the particular physiological and biochemical properties, while genotypic methods are based on the evaluation of interspecies differences in DNA sequences.

This work summarizes the available literature resources in the study area, and aims to evaluate the potential of PCR followed by HRMA: (1) in identification of bacteria, non-fermenting Gram-negative rods in particular, (2) in differentiation of genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex and (3) in identification of *Streptococcus milleri* group species (*S. anginosus*, *S. constellatus* and *S. intermedius*). We focus on these groups of bacteria, because they represent important pathogens that contribute to pulmonary exacerbations in cystic fibrosis patients.

The study included 1,140 bacterial isolates recovered from 402 clinical samples obtained from 126 patients suffering from bronchiectasis, cystic fibrosis or chronic obstructive pulmonary disease attending the Department of Respiratory Medicine and the Children's Clinic of the University Hospital Olomouc.

The first part dealt with the identification of bacteria, Gram-negative non-fermenting rods in particular. Phenotypic identification techniques included conventional phenotyping and MALDI-TOF MS. Genotypic identification techniques targeted the 16S rDNA V1 hypervariable region and included PCR with subsequent melting analysis (PCR-HRMA) and pyrosequencing.

The second part focused on differentiation of genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex, namely the clinically most relevant genomovars I to V, i.e. *B. cepacia* sensu stricto, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis* and *B. vietnamiensis*. Analysis of the *recA* gene was used as gold standard of genomovar identification, followed by evaluation of accuracy of (1) conventional phenotypic techniques, (2) genomovar-specific PCR with subsequent melting curve analysis of PCR products, (3) pyrosequencing and (4) MALDI-TOF MS. In this part, 28 clinical isolates previously identified as *Burkholderia cepacia* complex were analyzed. As expected, conventional phenotypic techniques were unable to differentiate the genomovars, however, pyrosequencing failed to do so as well. On the contrary, PCR-HRMA of the *recA* gene and MALDI-TOF MS achieved complete resolution of genomovars.

The third part of the study focused on species identification of *Streptococcus milleri* group (SMG) bacteria. Semi-selective McKay agar was used for SMG recovery. Real-time

PCR and nested PCR were used to differentiate the members of *Streptococcus milleri* group. In both cases, the PCR products were subjected to melting analysis. The techniques were tested on 40 isolates of *Streptococcus milleri* group bacteria.

Keywords:

bacterial species identification, PCR, melting analysis, pyrosequencing, MALDI-TOF MS, *Burkholderia cepacia* complex, *Streptococcus milleri* group

OBSAH

1. ÚVOD	12
1.1 METODY IDENTIFIKACE BAKTERIÍ	12
1.1.1 Fenotypové metody identifikace bakterií	13
1.1.1.1 MALDI-TOF MS	13
1.1.2 Genotypové metody identifikace bakterií	14
1.1.3 Analýza tání s vysokým rozlišením	16
1.1.3.1 Aplikace analýzy tání v mikrobiologii	18
1.1.4 Pyrosekvencování	19
1.2 CHRONICKÁ OBSTRUKČNÍ ONEMOCNĚNÍ PLIC	21
1.3 VYBRANÉ SKUPINY BAKTERIÍ U LIDÍ TRPÍCÍCH CHRONICKÝM OBSTRUKČNÍM ONEMOCNĚNÍM PLIC	22
1.3.1 Gramnegativní nefermentující tyčinky	23
1.3.1.1 Komplex <i>Burkholderia cepacia</i>	23
1.3.2 Skupina <i>Streptococcus milleri</i>	25
2. CÍLE PRÁCE	26
3. MATERIÁL A METODY	27
3.1 MATERIÁL	27
3.2 KULTIVACE BAKTERIÍ	28
3.3 MALDI-TOF MS	28
3.4 KONVENČNÍ FENOTYPOVÉ METODY A STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM	29
3.4.1 Test na stanovení aktivity oxidázy	29
3.4.2 Biochemická identifikace pomocí komerčních systémů	29
3.4.3 Klasifikace dle Lancefieldové	29
3.4.4 Testování hyaluronidázové aktivity	29
3.4.5 Detekce β -galaktosidázové aktivity	30
3.4.6 Testování citlivosti k antibiotikům	30
3.5 IZOLACE DNA	31
3.5.1 Izolace DNA komerční soupravou	31
3.5.2 Izolace DNA tepelnou lýzou	32
3.6 PCR S NÁSLEDNOU ANALÝZOU TÁNÍ	32
3.6.1 PCR-HRMA pro identifikaci bakterií	32
3.6.2 PCR-HRMA pro genomovariaci komplexu <i>Burkholderia cepacia</i>	33
3.6.3 PCR-HRMA pro určení druhů skupiny <i>Streptococcus milleri</i>	35
3.6.3.1 Real-time PCR-HRMA	35

3.6.3.2	Nested PCR-HRMA	35
3.6.3.3	Srovnání citlivosti real-time PCR a nested PCR s následnou analýzou tání	37
3.7	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	37
3.8	PYROSEKVENCOVÁNÍ	37
3.9	STANOVENÍ CITLIVOSTI, SPECIFITY A VÝKONU METOD	39
4.	VÝSLEDKY	40
4.1	SROVNÁNÍ MALDI-TOF MS, PYROSEKVENCOVÁNÍ A PCR-HRMA	40
4.2	VYUŽITÍ PCR-HRMA PRO IDENTIFIKACI BAKTERIÍ SE ZAMĚŘENÍM NA GRAMNEGATIVNÍ NEFERMENTUJÍCÍ TYČINKY	42
4.2.1	Rozlišení v rámci rodu <i>Pseudomonas</i> pomocí PCR-HRMA	44
4.3	ROZLIŠENÍ GENOMOVARŮ KOMPLEXU <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i>	44
4.3.1	Rozlišení genomovarů komplexu <i>B. cepacia</i> pomocí fenotypových metod	45
4.3.2	Aplikace PCR-HRMA pro genomovarizaci komplexu <i>Burkholderia cepacia</i>	46
4.3.3	Rozlišení genomovarů komplexu <i>Burkholderia cepacia</i> pomocí pyrosekvencování a MALDI-TOF MS	47
4.4	IDENTIFIKACE DRUHŮ SKUPINY <i>STREPTOCOCCUS MILLERI</i>	49
4.4.1	Identifikace SMG pomocí fenotypových metod	50
4.4.2	Identifikace SMG pomocí PCR-HRMA	51
4.4.2.1	Identifikace SMG pomocí real-time PCR	51
4.4.2.2	Identifikace SMG pomocí nested PCR	52
4.4.2.3	Srovnání citlivosti real-time PCR a nested PCR	54
5.	DISKUSE	55
6.	ZÁVĚRY	64
7.	POUŽITÁ LITERATURA	66
8.	PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY	76
8.1	PŮVODNÍ PUBLIKACE V ČASOPISECH S IMPAKT FAKTOREM	76
8.2	PŮVODNÍ PUBLIKACE V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH	76
8.3	PŘEHLEDOVÉ PUBLIKACE V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH	77
8.4	KAPITOLY V MONOGRAFIÍCH, UČEBNÍCH TEXTECH	77
8.5	ABSTRAKTY K PŘEDNÁŠKÁM A POSTERŮM (POUZE 1. AUTOR)	77
9.	SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ, PŘÍLOH A POUŽITÝCH ZKRATEK	79
9.1	SEZNAM TABULEK	79
9.2	SEZNAM OBRÁZKŮ	80
9.3	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	81

9.4 SEZNAM PŘÍLOH.....	81
------------------------	----

10. PŘÍLOHY

PŘÍLOHA I

Použité chemikálie, roztoky, reagentie a přístrojové vybavení

PŘÍLOHA II

Biochemické testy – vyhodnocení Rapid NF plus pro komplex *Burkholderia cepacia*

PŘÍLOHA III

Biochemické testy – vyhodnocení Rapid STR pro skupinu *Streptococcus milleri*

PŘÍLOHA IV

Seznam druhů a výsledky identifikace MALDI-TOF MS, pyrosekvencování a PCR-HRMA

1. ÚVOD

Cílem mikrobiologických laboratoří je zjistit složení bakteriální flóry ve vzorku, rozpoznat etiologické agens a posoudit jeho možný podíl na onemocnění pacienta (Greatorex a kol., 2014). Pro identifikaci mikroorganismů jsou používány fenotypové a genotypové metody. Fenotypové metody jsou založené na analýze fyziologických a biochemických vlastností, které jsou určeny vzájemným působením genotypu a prostředí. Genotypové metody jsou založené na analýze nukleových kyselin, případně proteinů (Zaidi a kol., 2003). Tyto metody zaznamenávají rozšíření od roku 1953, kdy byla popsána struktura DNA Watsonem a Crickem. Získané poznatky vedly k rozvoji oblasti molekulární biologie, která v posledních letech nachází uplatnění také v mikrobiologii. Na základě toho je možné rozdělit vývoj lékařské bakteriologie do dvou fází, (1) pre-molekulární a (2) molekulární. Tato oblast také přispívá k porozumění interakce mezi prostředím, hostitelem a mikroorganismem (Sussman, 2001).

1.1 Metody identifikace bakterií

Metody používané pro identifikaci bakterií by měly splňovat určitá kritéria jako je reprodukovatelnost, citlivost, rozlišovací schopnost a snadnost interpretace (Nielsen a kol., 2000). K průkazu etiologického agens v mikrobiologii jsou k dispozici metody přímé, kdy je přímo prokazována přítomnost mikroba, a nepřímé, kdy je prokazována reakce hostitelského organismu na přítomnost mikroba, typicky tvorba protilátek.

Jiný pohled dělí používané metody na fenotypové a genotypové. Fenotypové metody detekují vlastnosti vyjádřené bakteriemi ve fenotypu, např. morfologii kolonií a buněk, metabolickou aktivitu. Genotypové metody zahrnují analýzu DNA, RNA a proteinů (Arbeit, 1995).

Morfologická struktura buněk mikroorganismů není dostatečně variabilní a většinou je nedostatečná pro konečnou identifikaci. Pro podrobnější posouzení fenotypu je proto nutná kultivace, tzn. umělé pomnožení buněk bakterií na kultivačních půdách. Cílem kultivace je také získání čisté kultury z vyšetřovaného vzorku pro další analýzy (Reischl, 2006). Nedostatky fenotypových metod vyplňují genotypové metody, které často také umožňují detekci určitého infekčního agens i přímo z klinického materiálu, tedy bez potřeby kultivace (Greatorex a kol., 2014; Zaidi a kol., 2003; Tang a kol., 1998).

1.1.1 Fenotypové metody identifikace bakterií

V mikrobiologických laboratořích je stále hojně užívána kultivace. Problémem zde může být pomalé množení bakteriálních buněk nebo požadavek na specifické kultivační podmínky. Ke kultivaci některých obtížně kultivovatelných mikroorganismů, což jsou zejména intracelulární parazité, např. chlamydie, rickettsie a viry, je využíváno experimentálních zvířat, kuřecích embryí nebo tkáňových kultur.

Narostlá kultura poskytuje materiál pro fenotypovou analýzu (Tabulka I), která je založena na rozpoznání rozdílů v morfologii kolonií a buněk, fyzilogii, růstu, enzymatické aktivitě a dalších faktorech, např. na základě přítomnosti inkluzí a citlivosti k antibiotikům. K identifikaci bakterií slouží tedy také zjišťování jejich fyziologických vlastností pomocí biochemických testů, které detekují přítomnost aktivity různých enzymů. Z fyziologických vlastností se studuje vztah ke kyslíku, teplotě, pH, schopnost tolerance NaCl, využití zdrojů uhlíku a dusíku. Většina fenotypových vlastností je dána metabolismem živých a rostoucích buněk (Leven a kol., 2004; Reischel, 2006).

Tabulka I: Přehled vybraných fenotypových metod

Metody		Vyhodnocení
Konvenční fenotypové	mikroskopie	hodnocení morfologie buněk
	biochemické testy	hodnocení metabolické aktivity buněk
	sérotypizace	rozlišení dle reakce antigenních determinantů a specifické protilátky
	stanovení citlivosti vůči antibiotikům	hodnocení na základě citlivosti vůči antibiotikům
Molekulárně-biologické	elektroforetická typizace proteinů	hodnocení výsledku analýzy proteinů na gelu a reakce s protilátkou na blotu
	hmotnostní spektrometrie	hodnocení na základě porovnání spekter s databází

Upraveno podle Reischl (2006); O'Hara (2005) a Zaidi a kol. (2003).

1.1.1.1 MALDI-TOF MS

Od začátku 80. let se hmotnostní spektrometrie (MS, *Mass Spectrometry*) jeví jako vhodný robustní nástroj pro analýzu proteinů a v posledních letech zaznamenává aplikační rozmach také v mikrobiologii pro identifikaci bakterií. Umožňuje identifikaci čisté kultury,

získané kultivací, v některých případech i přímo z klinického vzorku. Výsledek je znám tentýž den, nebo druhý den pokud je nutná kultivace (Carbonnelle a kol., 2011).

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která stanovuje hmotnosti molekul po jejich převedení na ionty. Podstatou je separace iontů produkovaných iontovým zdrojem na základě jejich efektivní hmotnosti (m/z , kde 'm' značí hmotnost iontu a 'z' nábojové číslo) a následná detekce iontů detektorem. Vzorek je po smíchání s matricí vykrytalizován a následně ionizován pulzním laserem, kdy nejdříve dojde k ionizaci molekul matrice, které pak ionizují molekuly vzorku přenosem protonu z matrice. Ionizované částice pak vyletí ze vzorku a je měřena rychlost (čas) jejich letu do okamžiku jejich dopadu na detektor.

Měření probíhá v lineárním nebo reflektorovém módu. Při lineárním módu je dráha letu přímá a jsou analyzovány proteiny. Při reflektorovém módu je dráha letu prodloužena pomocí reflektorového iontového zrcadla a slouží pro analýzu peptidů. Technika je nazývána MALDI-TOF MS, tj. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*. Identifikace je potom založena na porovnání získaného hmotnostního spektra s rodově/druhově specifickými píky spekter v databázi (Sauer a Kliem, 2005; Valentine a kol., 2005; Keys a kol., 2004; Vaidyanathan a kol., 2002).

1.1.2 Genotypové metody identifikace bakterií

Genotypové metody jsou založené na studiu nukleových kyselin, a proto jsou na rozdíl od fenotypových metod méně citlivé ke změnám životních podmínek. Hlavní aplikace těchto metod v mikrobiologii se nacházejí ve třech oblastech: (1) detekce přítomnosti mikroorganismů, (2) druhová identifikace a (3) typizace (Belkum, 2003; Zaidi a kol., 2003). Kromě toho jsou genotypové metody využitelné také v rámci epidemiologických studií a při detailnější analýze genotypu (Alfaresi a Elkosh, 2006).

Genotypové metody (Tabulka II) jsou v prvním kroku založené buď na amplifikaci, nebo hybridizaci. Principem polymerázové řetězové reakce (PCR) je opakující se enzymatická syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA, ke které dochází po nasednutí dvou primerů, vážících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'OH-konce směřují proti sobě (Kubista a kol., 2006; Mackay a kol., 2002). Po amplifikaci nebo během ní je možno amplifikovanou sekvenci podrobněji analyzovat a to např. elektroforeticky, hybridizací se sondou nebo sekvencováním (Olive a Bean, 1999).

Technika PCR je vhodná pro amplifikaci molekul DNA, diagnostiku infekčních, případně genetických, onemocnění (např. mutací genů), detekci antimikrobiální rezistence (detekce genů rezistence) a mikrobiologickou diagnostiku (Louie a kol., 2000).

Tabulka II: Přehled vybraných genotypových metod

Metoda	Popis
HRMA (<i>High resolution melting analysis</i>)	během postupného zahřívání amplikonů dochází k tání dsDNA, uvolňování barviva a k poklesu fluorescence
RAPD (<i>Random amplified polymorphic DNA</i>)	typ PCR, kdy dochází k náhodné amplifikaci fragmentů templátové DNA pomocí jednoho krátkého primeru
Rep-PCR (<i>Repetitive extragenic palindromic-PCR</i>)	amplifikace různě velkých fragmentů DNA nekódujících repetitivních sekvencí (38 bp se šesti degenerovanými pozicemi a variabilní smyčkou o délce 5 bp mezi konci palindromatické sekvence)
AFLP (<i>Amplified fragment length polymorphism</i>)	metoda kombinuje PCR a štěpení restriční endonukleázou pro získání specifických restričních fragmentů
RFLP (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)	charakterizace DNA pomocí štěpení restričními endonukleázami
PFGE (<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>)	metoda pro separaci velkých molekul DNA v elektrickém poli, kdy se směr proudu mění v pravidelných intervalech
sekvencování DNA	zjišťování pořadí nukleotidů v DNA

Upraveno podle Trtková a Raclavský (2006), Olive a Bean (1999), Dijkshoorn a kol. (1996).

Hybridizační metody, zastoupené např. FISH (*Fluorescence in situ hybridization*), jsou založené na hybridizaci dvou navzájem komplementárních jednořetězcových molekul DNA (ssDNA) nebo RNA (ssRNA), kdy jedna je značená (např. fluorescenčně) a slouží jako sonda k detekci specifické sekvence ve druhé molekule, např. v cytologických preparátech, biofilmech, sedimentech a vzorcích vod. V mikrobiologii je tato metoda využitelná jen pro druhovou identifikaci, nikoli pro typizaci.

Pro genetickou analýzu je nejčastěji využívána ribozomální DNA (rDNA), tj. geny pro ribozomální RNA (rRNA), např. 16S rDNA. Molekuly rRNA jsou důležité pro buněčný růst, funkce a přežití organismu. Oblast 16S rDNA genu obsahuje devět variabilních oblastí označených V1-V9, kde každá je lemovaná vysoce evolučně konzervovanými sekvencemi, které jsou optimální pro návrh primerů (Chakravorty a kol., 2007; Amann a kol., 1997).

Další využívanou oblastí je 23S rDNA a jiné evolučně konzervované geny, např. *hsp65* a *gyrB* (Reischl, 2006).

Pro epidemiologické studie je důležitá identifikace až na úroveň kmenů. Nejčastěji používanými technikami pro tento účel jsou RAPD, Rep-PCR, AFLP, PFGE, RFLP a sekvencování, zastoupené metodou multilokusové sekvenční typizace (MLST) (Belkum, 2003; Olive a Bean, 1999).

Genotypové metody mají společnou schopnost rozlišení nižších taxonomických skupin na základě rozdílů v sekvenci DNA. Nejspolehlivějším a nejlépe rozlišujícím postupem je sekvencování vhodných oblastí. V principu jde o asymetrickou PCR, zaměřenou na specifickou oblast, kdy je amplifikován jen jeden řetězec, následně se standardně pokračuje přečištěním, sekvenační reakcí a kapilární elektroforézou v polyakrylamidovém gelu.

Tradiční sekvenátory fungují na základě dideoxy metody (Sangerova metoda), kdy vložení dideoxynukleotidu (ddNTP) zakončí prodlužování řetězce, produkty jsou tříděny v gelu a získané výsledky jsou vyhodnoceny pomocí specializovaného softwaru (Sanger a kol., 1977; Chen, 2014). Méně nákladnou a pro účely mikrobiologické identifikace a typizace dostačující technikou je pyrosekvencování (viz 1.1.4), jedna z technik sekvencování nové generace (Maiwald, 2004).

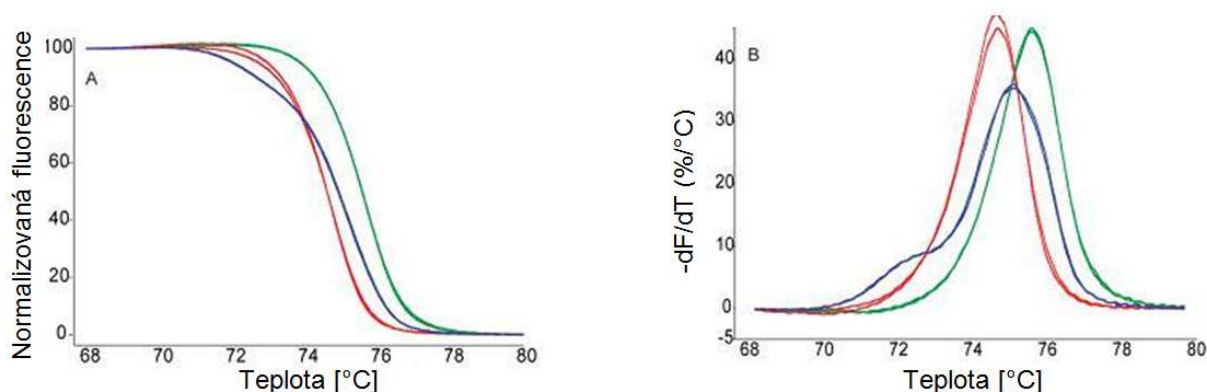
1.1.3 Analýza tání s vysokým rozlišením

Analýza tání s vysokým rozlišením (*High resolution melting analysis*, HRMA) je vysoce citlivá a rychlá technika, sloužící zejména k detekci jednonukleotidových polymorfismů (SNPs, *Single nucleotide polymorphism*). Vysokého rozlišení je dosaženo pomocí tzv. DNA saturujících barviv (např. LCGreen). Pro správnou detekci studovaných produktů je nejdůležitější specifita PCR (Vossen a kol., 2009; Wittwer, 2009; deSilva a Blackett, 2007; Hermann a kol., 2006).

Analýza má i několik limitujících faktorů. Správný průběh závisí na dobře provedené specifické PCR, použité instrumentaci a saturujícím barvivu. Fluorescenční barvivo se může navázat na jinou než zkoumanou molekulu dsDNA, např. na primerové dimery. Všechny složky PCR směsi, jejich koncentrace a změny teploty mají vliv na tvar křivky tání a absolutní pozici a šířku píku derivované křivky tání. Nejvhodnější délkou sekvence pro analýzu tání je 400 bp (Wittwer, 2009; Hermann a kol., 2006).

Během postupného zahřívání dochází k 'tání' dsDNA produktu PCR a následkem toho k uvolňování interkalovaného barviva a poklesu fluorescence. Sekvenční varianty jsou detekovány jako změny profilu křivky tání, která je získána monitorováním zmíněné vyzařované fluorescence (Vossen a kol., 2009; Wittwer, 2009; deSilva a Blackett, 2007; Montgomery a kol., 2007). Průběh křivky tání konkrétní molekuly DNA závisí na její délce a sekvenci. Proces denaturace lze také charakterizovat tzv. teplotou tání (*Melting temperature*, T_m), která je definována jako teplota, kdy je právě 50 % přítomných molekul dsDNA ve formě ssDNA (Vossen a kol., 2009; Reischl, 2006).

Získaná data jsou zpracována pomocí počítačového programu. Porovnáním získaných normalizovaných křivek tání, respektive profilů tání (Obrázek 1A), nebo srovnáním poloh píků v derivovaných křivkách (Obrázek 1B) je možné provést rozlišení a identifikaci amplifikovaných molekul DNA (Wittwer, 2009; Erali a kol., 2008).



Obrázek 1: Křivky tání: A) normalizované křivky tání, B) derivované křivky tání, vypočtené jako záporná derivace fluorescence na teplotě ($-dF/dT$)

Upraveno podle Erali a kol. (2008).

Technika HRMA je v klinických laboratořích zpravidla používána pro rychlou detekci přítomnosti variant genů, např. mutace v genu *MTHFR*, který kóduje methylenetetrahydrofolát reduktázu, která hraje roli v přeměně homocysteinu na methionin. Při poruše nebo nedostatku tohoto enzymu dochází k poruchám srážlivosti krve (Sinthuwiwat a kol., 2008). Jiným příkladem je detekce mutací v genu *K-ras*, který je součástí signální kaskády EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) a kóduje protein s GTP-ázovou aktivitou a účastní se přenosu signálu od aktivovaného receptoru do jádra buňky (Krypuy a kol., 2006).

1.1.3.1 Aplikace analýzy tání v mikrobiologii

PCR-HRMA je často používána pro (1) identifikaci mikroorganismů, (2) genotypizaci mikrobiálních druhů a (3) detekci genotypových variant, které vedou ke vzniku rezistence k antimikrobiálním látkám. Při identifikaci druhů se nejčastěji používá HRM analýza ribozomálních genů (Tong a Giffard, 2012).

V rámci studie Wong a kol. (2014) byla vyvinuta PCR-HRMA pro identifikaci pěti nozokomiálních bakteriálních patogenů (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*). Primery byly zacíleny na druhově specifické oblasti tak, že charakteristická teplota tání umožnila spolehlivou identifikaci.

Použitelnost HRMA pro identifikaci klinicky významných bakterií je možné demonstrovat také na studiích Yang a kol. (2009), Cheng a kol. (2006) a Klaschik a kol. (2004), které se zabývaly analýzou tání 16S rDNA, která umožnila přímo identifikovat bakteriální rod nebo druh, případně byla použita fluorescenčně značená sonda. Klaschik a kol. (2004) využívali dvou sond, jedné specifické pro produkty získané amplifikací oblasti u grampozitivních a druhé u gramnegativních bakterií.

Studie Jeng a kol. (2012) se zabývala srovnáním identifikace bakterií z hemokultur pomocí PCR s následnou analýzou tání (PCR-HRMA) a hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (PCR-ESI-MS). Autoři identifikovali celkem 70 bakteriálních kultur náležejících k druhům: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium varium*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pyogenes* a *S. viridans*. Při identifikaci na úroveň rodu byly lépe hodnoceny výsledky získané metodou PCR-ESI-MS. Naopak při podrobnější identifikaci, až na úroveň druhu, vykazovala větší spolehlivost identifikace metoda PCR-HRMA. Spolehlivost identifikace na úroveň rodu a druhu pomocí PCR-HRMA a PCR-ESI-MS je srovnána v Tabulce III.

Předchozí text demonstroval využití PCR-HRMA pro identifikaci bakterií, ale tato metoda má také využití u kvasinek a virů. Costa a kol. (2010) se zabývali genotypizací *Candida albicans* pomocí PCR s následnou analýzou tání s vysokým rozlišením (HRMA) a pomocí délkového polymorfismu mikrosatelitů. Epsy a kol. (2006) použili PCR-HRMA s využitím hybridizačních sond FRET a *molecular beacon* pro identifikaci rozlišení typů viru *Herpes simplex 1* a *2* (HSV-1 a HSV-2).

Tabulka III: Srovnání spolehlivosti identifikace rodu/druhu 70 bakteriálních kultur pomocí PCR-HRMA a PCR-ESI-MS

			PCR-HRMA	PCR-ESI-MS
Identifikace na úroveň	rodu	počet identifikovaných izolátů	63	66
		spolehlivost [%]	90,0	94,3
	druhu	počet identifikovaných izolátů	63	60
		spolehlivost [%]	90,0	85,7

Upraveno podle Jeng a kol. (2012).

HRM analýza byla také použita k detekci variant genů spojených s rezistencí k antimikrobním látkám. Příkladem může být testování rezistence *Mycobacterium tuberculosis*, kdy běžné difúzní metody jsou časově náročné. Pro léčbu tuberkulózy (TBC) se používá rifampicin, chinolony a isoniazid. HRM analýza je v tomto případě založena na detekci mutace v genech *rpoB* (pro rezistenci k rifampicinu), *gyrA* (pro rezistenci k chinolonům) a *katG* a promotoru *mabA-inhA* (pro rezistenci k isoniazidu). Specifita HRMA byla 98-100 % a většina falešně pozitivních výsledků byla způsobena synonymní mutací, která ovšem nemá vliv na citlivost, respektive vznik rezistence (Chen a kol., 2011).

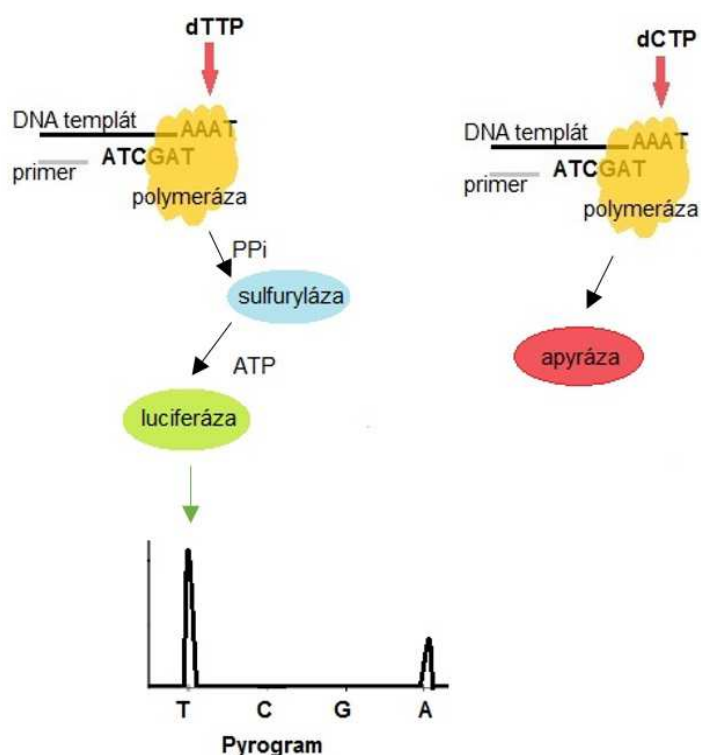
Z uvedených poznatků a studií vyplývá, že technika analýzy tání s vysokým rozlišením je v oblasti mikrobiologie v principu použitelná pro detekci a identifikaci klinicky významných druhů bakterií, kvasinek a virů, ale je potřebné si uvědomit nutnost zaměření na určitou skupinu bakterií pro dosažení dostatečně specifických výsledků.

1.1.4 Pyrosekvencování

Pyrosekvencování je neelektroforetická metoda sekvencování DNA, která využívá syntézy komplementárního vlákna pomocí DNA polymerázy. Princip syntézy byl poprvé popsán v roce 1985 a je založen na postupném přidávání nukleotidů k templátové DNA dle komplementarity (Nyrén, 1987; Melamede, 1985). Opírá se o real-time detekci pyrofosfátu (PPi) uvolněného po přidání a inkorporaci známého nukleotidu v průběhu syntézy DNA za účasti DNA polymerázy. Jeden cyklus trvá asi jednu minutu a zahrnuje kaskádu čtyř enzymatických reakcí prováděných v homogenním kapalném prostředí (Wong a kol., 1991). Tyto reakce jsou katalyzované Klenow fragmentem DNA polymerázy I (Klenow a kol., 1971), ATP sulfurylázou (Segel a kol., 1987), luciferázou (Deluca, 1976) a apyrázou (Komoszynski

a Wojtzak, 1996). Reakční směs obsahuje nukleotidy, sekvenační primer, templátovou DNA, zmíněné enzymy a také substráty adenosin fosfosulfát (APS) a luciferin. Jako templát je použit PCR produkt, kdy je jeden primer pro PCR značen biotinem, který umožňuje přečištění sekvenačního templátu pomocí specifické reakce biotin-streptavidin.

DNA polymeráza katalyzuje inkorporaci určitého nukleotidu od sekvenačního primeru. Po inkorporaci nukleotidu dojde k uvolnění pyrofosfátu, který je přeměněn na ATP za katalýzy ATP-sulfurylázy. Následuje luciferázová reakce vedoucí k produkci fotonů (světla), kdy je luciferin oxidován za účasti ATP. Nezabudované nukleotidy jsou degradovány enzymem apyrázou (Obrázek 2) (Ahmadian a kol., 2006).



Obrázek 2: Schématické znázornění principu pyrosekvencování

Upraveno podle Ahmadian a kol. (2006).

Yang a kol. (2014) se zabývali určováním patogenů u pacientů trpících bronchiektáziemi, kdy je ve 30-40 % případů problém určit patogena. K pyrosekvencování byl použit přístroj 454 GS Junior. Metagenomická analýza podala informace o složení bakteriální komunity ve vzorku. Více než polovina vzorků obsahovala *Pseudomonas aeruginosa*, což se shodovalo s výsledky kultivace, ale bylo zjištěno o dva dny dříve, což má význam pro včasnou diagnostiku a léčbu.

Song a kol. (2014) se ve své studii zabývali určením profilu patogenů způsobujících pyogenní jaterní absces (PLA) pomocí pyrosekvencování 16S rDNA systémem 454 GS Junior. Výsledky ukázaly, že 90% vzorků punktátu z PLA obsahuje jeden nebo více rodů známých bakterií, jako jsou *Klebsiella*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus* a blíže nespecifikované zástupce čeledi *Enterobacteriaceae*.

Lin a kol. (2013) se ve své studii zabývali detekcí rezistence u *Mycobacterium tuberculosis*, kdy běžné metody testování citlivosti mohou trvat 4 týdny i déle. Vyvinuli test založený na pyrosekvencování obsahující 8 dílčích stanovení pro rychlou identifikaci komplexu *Mycobacterium tuberculosis* a souběžnou detekci mutací spojených s rezistencí. Celý proces, od izolace DNA až po získání výsledků, vyžadoval 6 hodin. Test byl schopen rychle a přesně detekovat mutace způsobující lékové rezistence.

1.2 Chronická obstrukční onemocnění plic

Chronická obstrukční onemocnění plic jsou charakterizována ztíženým prouděním vzduchu v dýchacích cestách. Řadíme sem bronchiektázie (BE), cystickou fibrózu (CF) a chronickou obstrukční plicní nemoc (CHOPN).

Bronchiektázie (BE) mohou být získané nebo vrozené. U pacienta dochází k abnormálnímu rozšíření průdušek, ve kterých se hromadí hlen. Vrozená forma je dána genetickým defektem průduškových chrupavek, kdy defektní chrupavka není schopna udržet trubcovitý tvar průdušek, které se začnou vakovitě rozšiřovat. Získaná forma je následkem jiných chorob, např. opakovaných zánětů plic, a to zejména v dětském věku. Tato diagnóza s sebou nese četné komplikace, z nichž nejzávažnější jsou opakované infekce dýchacích cest (Keinstinen a kol., 1997).

Cystická fibróza (CF), neboli mukoviscidóza, je vrozené multisystémové onemocnění charakterizované poruchou funkce žláz s vnější sekrecí, produkujících hlen v rámci respiračního a trávicího traktu, a potních žláz. V buňkách plic a střev dochází k poruše transportu chloridových iontů (Cl⁻) přes buněčnou membránu a následně také k narušení správné regulace jiných iontových kanálů. Výsledkem je akumulace chloridových a sodných iontů mimo buňky. Akumulace těchto iontů vede k akumulaci hlenu v plicích, kde dochází k uzavírání bronchiolů a následně k dýchacím obtížím. V případě střevní formy CF dochází k zahuštění sekretu slinivky břišní s následnou ztrátou produkce trávicích enzymů, které je nutné uměle dodávat. U mužů dochází k zahuštění seminální tekutiny, uzávěru chámovodu

a následné neplodnosti. Nemoc se projeví jen u jedinců, kteří mají defektní variantu v obou alelách genu kódujícího chloridový kanál epitelových buněk (*Cystic fibrosis transmembrane regulator*, *CFTR*), který je lokalizován na chromozomu 7. Jde o recesivně homozygotně dědičné onemocnění.

Osoby trpící CF jsou náchylné k plicním infekcím se širokým okruhem bakteriálních původců. Typickými patogeny jsou *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, komplex *Burkholderia cepacia* a jiné gramnegativní nefermentující tyčinky, zahrnující zejména *Stenotrophomonas maltophilia* a *Achromobacter xylosoxidans* (Coyene a kol., 2005; Grody, 1999).

Chronická obstrukční plicní nemoc (*Chronic obstructive pulmonary disease*, CHOPN) je onemocnění charakterizované řadou symptomů, zejména bronchitidou a destrukcí plicního parenchymu, kdy dojde k rozšíření dýchacích cest spojenému s destrukcí stěny bez přítomnosti fibrózy, následkem čehož dojde k omezení průtoku vzduchu v průdušnicích, tj. k nevrátne bronchiální obstrukci. Jedná se tedy o postupně se zhoršující onemocnění dýchací soustavy, které se vyznačuje poškozením plicní tkáně. Vnitřním rizikovým faktorem je genetická výbava a vnějšími faktory jsou kouření cigaret, riziková povolání, znečištění ovzduší a opakující se bronchopulmonální infekce. Genetické příčiny se vyskytují vzácněji, např. genetický defekt, který má za následek nedostatek enzymu α 1-antitrypsinu, který hraje roli při fyziologické opravě plicní tkáně (Musil a kol., 2005; <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/116147/chronic-obstructive-pulmonary-disease-COPD>).

1.3 Vybrané skupiny bakterií u lidí trpících chronickým obstrukčním onemocněním plic

Osoby trpící chronickým obstrukčním onemocněním plic jsou náchylné k bakteriálním infekcím, zejména nefermentujícími gramnegativními tyčinkami. Mezi emergentní patogeny jsou nově u cystické fibrózy řazeny streptokoky skupiny *milleri* (SMG, *Streptococcus milleri group*), kde má SMG podíl na části bronchopulmonálních exacerbací (Parkins a kol., 2008). V této práci jsme se zaměřili na podrobnější charakterizaci nefermentujících tyčinek rodu *Burkholderia* a streptokoků skupiny *milleri*, proto je dále uveden podrobnější přehled jen k těmto vybraným skupinám patogenů.

1.3.1 Gramnegativní nefermentující tyčinky

Rostoucí výskyt infekcí způsobených zástupci nefermentujících gramnegativních tyčinek, zejména náležející k rodům *Burkholderia*, *Pseudomonas* a *Stenotrophomonas* je zapříčiněn schopností produkovat široké spektrum hydrolytických enzymů, např. β -laktamáz, které znesnadňují terapii (Endimiani a kol., 2002). Tato skupina bakterií se také vyznačuje odolností vůči dezinfekčním prostředkům (Quinn, 1998).

Mellmann a kol. (2008) se ve své studii zabývali detekcí a identifikací nefermentujících gramnegativních tyčinek u lidí trpících CF. PCR byla zaměřena na 16S rDNA gen a pak následovala identifikace pomocí MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry*). Několik studií (Reik a kol., 2005; Coenye a kol., 2001; Henry a kol., 2001 a Whitby a kol., 2000) se zabývalo identifikací gramnegativních nefermentujících tyčinek, hlavně komplexu *Burkholderia cepacia* ve vzorcích pocházejících od pacientů trpících CF, a to pomocí fenotypových testů, enzymové analýzy, AFLP, RFLP, analýzy mastných kyselin a PCR s primery zacílenými na gen *recA*.

1.3.1.1 Komplex *Burkholderia cepacia*

Z gramnegativních nefermentujících tyčinek je zajímavá *Burkholderia cepacia*, která byla poprvé popsána roku 1949 jako původce hniloby cibulovitých rostlin a teprve později, v padesátých letech 20. století, jako oportunní lidský patogen způsobující nozokomiální infekce. Závažnost infekce spočívá v primární rezistenci na většinu antibiotik a ve snadném šíření mezi pacienty.

Problém konvenční identifikace *Burkholderia cepacia* spočívá v existenci několika geneticky příbuzných druhů, tzv. genomovarů. V současné době je známo 17 genomovarů souhrnně označovaných jako komplex *Burkholderia cepacia* (Tabulka IV), které mají různý epidemiologický význam a patogenní potenciál (Henry a kol., 1997; Mahenthiralingam a kol., 1996). Některé současné genomovary byly původně identifikovány jako samostatné druhy, např. *B. multivorans* popsána v roce 1959 Morisem a Robertsem, ale pojmenovaná až v roce 1966 (Stanier a kol., 1966). Do roku 2005 bylo určeno 10 genomovarů (Reik a kol., 2005) a za posledních 10 let bylo popsáno dalších 7 genomovarů (<http://bccm.belspo.be/index.php>). Na základě fylogenetické podobnosti genu *recA* jsou

u genomovaru III rozlišovány čtyři podtypy označované A, B, C a D (Vandamme a kol., 2003) z nichž se nejčastěji vyskytují podtypy A a B (Holden a kol., 2009; Correia a kol., 2008).

Tabulka IV: Seznam genomovarů komplexu *Burkholderia cepacia*

Genomovar	Binomický název
I	<i>B. cepacia</i>
II	<i>B. multivorans</i>
III	<i>B. cenocepacia</i>
IV	<i>B. stabilis</i>
V	<i>B. vietnamiensis</i>
VI	<i>B. dolosa</i>
VII	<i>B. ambifaria</i>
VIII	<i>B. anthina</i>
IX	<i>B. pyrrocinia</i>
X	<i>B. ubonensis</i>
XI	<i>B. latens</i>
XII	<i>B. diffusa</i>
XIII	<i>B. arboris</i>
XIV	<i>B. seminalis</i>
XV	<i>B. metallica</i>
XVI	<i>B. lata</i>
XVII	<i>B. contaminans</i>

Převzato z <http://bccm.belspo.be/index.php>; <http://www.lmg.cz/index.php?kategorie=2&lang=cze&text=10>.

Nejčastěji se v klinickém materiálu vyskytují genomovary I, II a III. Největší komplikace, tedy zhoršení funkce plic a tzv. 'cepacia syndrom', jsou způsobovány genomovarem III. Zástupci komplexu *Burkholderia cepacia* bývají nejčastěji diagnostikováni u imunokomprimovaných pacientů a u pacientů trpících cystickou fibrózou. Závažnost infekce je podmíněna výskytem primární rezistence k většině β -laktamových antibiotik a také tím, že se může mezi pacienty snadno šířit, což má velký epidemiologický význam.

Z popsaných 17 genomovarů je z epidemiologického hlediska i co se patogenity týče nejvýznamnějších prvních pět genomovarů. Určení genomovaru má význam zejména z epidemiologického hlediska, kdy je sledováno šíření kmenů mezi pacienty. Fenotypové metody neumožňují identifikaci genomovarů komplexu *Burkholderia cepacia*, ale pouze určí příslušnost k tomuto komplexu (Zahariadis a kol., 2003; Coyene a kol., 2001).

Mahenthiralingam a kol. (2000) použili k identifikaci 35 izolátů náležejících ke komplexu *Burkholderia cepacia*: (1) RFLP analýzu 16S rDNA s restriční endonukleázou *HaeIII*, (2) RFLP analýzu s univerzálními primery s restriční endonukleázou *HaeIII* a (3) genomovar-specifickou PCR zacílenou na gen *recA*. Analýza fragmentu 16S rDNA neumožnila rozlišení genomovarů I, III a IV, ale analýza fragmentu genu *recA* umožnila rozlišení genomovarů I až V. V rámci zmíněné studie byly navrženy specifické primery pro genomovary I až V, které další autoři (Henry a kol., 2001; Dřevínek a kol., 2002; Reik a kol., 2005; Hanulík a kol., 2013) převzali a validovali výsledky získané ve studii Mahenthiralingam a kol. (2000).

1.3.2 Skupina *Streptococcus milleri*

Skupina *Streptococcus milleri* (*Streptococcus milleri* group, SMG), označovaná někdy také jako skupina *Streptococcus anginosus* (*Streptococcus anginosus* group, SAG), zahrnuje druhy *S. anginosus*, *S. intermedius* a *S. constellatus*, které mají podobné hemolytické, sérologické a fyziologické vlastnosti (Whiley a kol., 1991; Verall, 1986). Dnes jsou tyto streptokoky známy jako etiologická agens různých hnisavých infekcí, ale kvůli svým heterogenním morfológickým charakteristikám (anhemolytické i viridující) mohou být v diagnostice opomenuty nebo chybně identifikovány (Ruoff, 1988). Jejich jedinečnou vlastností, která je odlišuje od jiných patogenních streptokoků, např. *S. pyogenes* a *S. agalactiae*, je jejich schopnost způsobovat abscesy (Rashid a kol., 2007; Gossling, 1988).

Nedávno byli zástupci SMG popsáni také jako původci bronchopulmonálních exacerbací u pacientů trpících cystickou fibrózou. Rutinní detekce je omezena, a proto byl vyvinut McKay agar pro semi-selektivní izolaci druhů této skupiny (Sibley a kol., 2010). Další možností izolace je semi-selektivní krevní agar obsahující nalidixovou kyselinu a sulfametazin, tzv. NAS agar, kdy následná kultivace probíhá za anaerobních podmínek (Waite a kol., 2011). Je také vyvinuto několik PCR systémů pro detekci a identifikaci SMG (Olson a kol., 2010; Jacobs a kol., 1996).

2. CÍLE PRÁCE

Cílem předložené doktorské disertační práce bylo:

1. Průběžně shromažďovat primární izoláty bakterií pocházející z klinických vzorků z horních a dolních cest dýchacích od pacientů trpících bronchiectáziemi, cystickou fibrózou nebo chronickou obstrukční plicní nemocí.
2. Získané bakteriální izoláty identifikovat pomocí konvenčních mikrobiologických metod, MALDI-TOF MS, PCR-HRMA a pyrosekvencování.
3. Výsledky identifikace pomocí použitých metod mezi sebou srovnat a vyhodnotit jejich citlivost a specifitu.
4. Zhodnotit potenciál použití PCR-HRMA v rutinní identifikaci se zaměřením na gramnegativní nefermentující tyčinky.
5. Aplikovat PCR-HRMA pro genomvariaci komplexu *Burkholderia cepacia*.
6. Srovnat několik systémů PCR s následnou analýzou tání pro identifikaci a rozlišení streptokoků skupiny *milleri*.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

Do studie bylo zahrnuto 1140 bakteriálních izolátů, které byly získány z 292 vzorků sput a 110 výtěrů z nosu a krku od 126 pacientů v péči Kliniky plicních nemocí a tuberkulózy a Dětské kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, trpících bronchiektáziemi (BE), cystickou fibrózou (CF) nebo chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN). Izoláty byly získávány v rámci rutinního provozu Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc v období od června 2012 do června 2014. Tyto izoláty byly v rámci rutinního provozu identifikovány pomocí konvenčních fenotypových metod a následně uloženy do sbírky klinických izolátů bakterií Ústavu mikrobiologie. Izoláty byly dále podrobeny identifikaci pomocí MALDI-TOF MS, PCR-HRMA a pyrosekvencování. Seznam použitých chemikálií, roztoků, reagensů a přístrojového vybavení je uveden v Příloze I.

Pro validaci PCR-HRMA pro rozlišení genomů komplexu *Burkholderia cepacia* byly použity referenční kmeny (Tabulka V) z belgické sbírky BCCM/LMG (*Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Laboratory for Microbiology of the Faculty of Sciences of Ghent University*) v Gentu.

Tabulka V: Referenční kmeny pro validaci PCR-HRMA pro rozlišení genomů komplexu *Burkholderia cepacia*

Druhové pojmenování	Genomovar	Sbírkové číslo BCCM/LMG
<i>Burkholderia cepacia</i>	I	LMG 1222
<i>Burkholderia multivorans</i>	II	LMG 13010
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III podtyp B	LMG 16656
<i>Burkholderia stabilis</i>	IV	LMG 14294
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	V	LMG 10929

3.2 Kultivace bakterií

Klinické vzorky byly primokultivovány na: (1) Columbia krevním agaru (*Columbia agar with sheep blood* – 5 %, CBA, PB5008A, Oxoid), (2) selektivní půdě pro burkholderie (*Burkholderia cepacia agar*, BCA, PO0938A, Oxoid), (3) McKay agaru pro SMG (Sibley a kol., 2010; připraveno na zakázku, Oxoid) a (4) na selektivním čokoládovém agaru s bacitracinem a Vitoxem pro hemofily (*Haemophilus selective agar – Chocolate agar with Vitox and bacitracin*, HAEM, PO5097A, Oxoid) ve vlhké komůrce v inkubátoru při 37 °C (CBA, HAEM, McKay) nebo 30 °C (BCA) po dobu až 10 dní. Suspektní bakteriální kolonie studovaných patogenů byly subkultivovány na CBA nebo čokoládovém agaru s Vitoxem (*Chocolate agar with Vitox*, CHOCV, PO5090A, Oxoid) a uloženy v kryozkumavkách (kryobanka, ITEST) při -80 °C.

3.3 MALDI-TOF MS

Analýza pomocí MALDI-TOF MS byla prováděna na přístroji Microflex od firmy Bruker podle manuálu výrobce za použití matrice HCCA (*α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid*, Sigma-Aldrich). Matrice HCCA byla resuspendována v 1 ml standardního solventu (acetonitril 50 %, voda 47,5 % a trifluoroctová kyselina 2,5 %) dle pokynů výrobce a následně vortexována dokud nebyl roztok čirý. Takto připravená matrice byla používána do vyčerpání. Na pozici na destičce z leštěné oceli byl nanesen biologický materiál, tj. bakteriální kultura. Pokud se jednalo o mukoidní nebo opouzdřený kmen, byl pro zlepšení výsledku identifikace nanesený vzorek převrstven 0,75 μ l kyseliny mravenčí, která narušuje buněčnou stěnu a extrahuje proteiny z buněčného obsahu. Nanesený vzorek byl poté vždy převrstven 0,75 μ l roztoku matrice. Po zaschnutí bylo provedeno měření systémem MALDI-TOF MS a identifikace srovnáním získaného spektra s databází typických spekter pomocí softwaru MALDI Biotyper 3.0. Pravděpodobnost správné identifikace je udávána pomocí skóre. MALDI Biotyper skóre $\geq 2,0$ označuje spolehlivé určení rodu a pravděpodobnou identifikaci na úroveň druhu, skóre $\geq 1,7$ a $< 2,0$ udává pravděpodobnou identifikaci rodu.

3.4 Konvenční fenotypové metody a stanovení citlivosti k antibiotikům

3.4.1 Test na stanovení aktivity oxidázy

Pro stanovení aktivity oxidázy u gramnegativních nefermentujících bakterií byl použit komerční OXItest (PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.). Na indikační proužek byla pomocí bakteriální kličky rozetřena jedna bakteriální kolonie. V případě zpozorování rychlého intenzivního zmodrání byl vzorek vyhodnocen jako oxidáza pozitivní (N,N-dimethyl-1,4-fenyldiamin a α -naftol vytvoří při kontaktu s oxidázou indolfenolovou modř), jinak byl vzorek oxidáza negativní.

3.4.2 Biochemická identifikace pomocí komerčních systémů

Komerční systémy, tj. RapID NF plus (Remel) pro identifikaci nefermentujících bakterií a RapID STR (Remel) pro identifikaci streptokoků, obsahují kompletní řadu biochemických testů pro identifikaci určité skupiny bakterií a poskytují výsledek za 4 hodiny. Soupravy byly použity dle pokynů výrobce. Po vyhodnocení testů byla provedena identifikace na základě pozitivitu a negativitu pomocí počítačového programu ERIC. Bližší specifikace jednotlivých testů v panelu RapID NF plus je uvedena v Příloze II a systému RapID STR v Příloze III.

3.4.3 Klasifikace dle Lancefieldové

Klasifikace dle Lancefieldové u druhů skupiny *Streptococcus milleri* byla provedena pomocí komerční soupravy *PathoDextra Strep grouping kit* (Thermo Scientific) dle pokynů výrobce. Byla připravena bakteriální suspenze a následně aglutinací s protilátkou anti-A až F stanovena příslušná skupina.

3.4.4 Testování hyaluronidázové aktivity

Aktivita hyaluronidázy u druhů skupiny *Streptococcus milleri* byla detekována pomocí tzv. dekapsulačního testu. V případě, že izolát produkuje enzym hyaluronidázu, dojde k rozkladu hyaluronanu v pouzdře, který je produkován druhem *Streptococcus equi* (Andrysík a kol., 2004; Skalka, 1985).

Na krevní agar byla naočkována širší linie *S. equi* a kolmo k této linii byly očkované čáry izolátů testované SMG izoláty tak, aby tyto čáry pronikaly 1-2 mm do linie *S. equi*. Naočkováná plotna byla kultivována ve vlhké komůrce v inkubátoru s 5% CO₂ při 37 °C po dobu 24 h. Jako pozitivní výsledek byla hodnocena makroskopicky viditelná zábrana tvorby pouzdra v okolí kontaktu s očkovací čarou testovaného izolátu SMG.

3.4.5 Detekce β -galaktosidázové aktivity

Pro stanovení aktivity β -galaktosidázy u druhů skupiny *Streptococcus milleri* byl použit tzv. komerční ONP test (Diagnostics s.r.o.). Byla připravena bakteriální suspenze ve zkumavce, do které byl vložen detekční proužek. Následně byl vzorek inkubován při teplotě 37 °C po dobu 24 h a poté vyhodnocen. Pokud bylo pozorováno žluté zbarvení tekutiny, byl testovaný izolát hodnocen jako β -galaktosidáza pozitivní, protože došlo ke štěpení bezbarvého substrátu orto-nitrofenyl-beta-galaktosidu β -galaktosidázou za uvolnění žlutého orto-nitrofenolu.

3.4.6 Testování citlivosti k antibiotikům

Citlivost k antibiotikům u druhů skupiny *Streptococcus milleri* byla testována diskovou difúzní metodou. Z 24 hodin staré kultury na krevním agaru byla připravena suspenze bakteriálního izolátu v MH (Mueller-Hinton) bujónu, která byla očkována přelivem na povrch krevního agaru a následně byla nadbytečná tekutina slita. Po zaschnutí povrchu agaru byly nakladyeny disky napuštěné standardním množstvím antibiotik a plotna byla kultivována při 37 °C s přídatkem 5% CO₂ v atmosféře po dobu 24 hodin. Po inkubaci byl měřen průměr inhibičních zón a na základě porovnání s hraničními hodnotami pro dané antibiotikum (Tabulka VI) bylo zjištěno, zda je daný izolát rezistentní nebo citlivý. V případě stanovení minimální inhibiční koncentrace penicilinu E-testem (benzylpenicilin 0,002-32 μ g/ml) byla jako hraniční hodnota použita koncentrace 0,25 μ g/ml, tzn. při hodnotě nižší nebo rovné 0,25 μ g/ml byl izolát hodnocen jako citlivý.

Tabulka VI: Hraniční hodnoty inhibičních zón v okolí disků s antibiotiky, používané pro rod *Streptococcus*

Antibiotikum	Hraniční hodnota [mm]
penicilin (6 µg)	14
kontrimoxazol (sulfamethoxazol/trimethoprim 1,25/23,75 µg)	16
tetracyklin (30 µg)	19
cefepim (30 µg)	18
erytromycin (15 µg)	21
klindamycin (2 µg)	19

3.5 Izolace DNA

3.5.1 Izolace DNA komerční soupravou

Izolace DNA byla prováděna pomocí komerční soupravy *GeneProof DNA isolation kit* (GeneProof) podle doporučení výrobce. Jedna bakteriální kolonie byla sklizena bakteriální kličkou a suspendována ve 200 µl deionizované vody v mikrozkušavce typu Eppendorf o objemu 1,5 ml. K této suspenzi bylo přidáno 25 µl proteinázy K (koncentrace 22,2 mmol/l) a 200 µl pufru 3. Tato směs byla promíchána vortexováním a inkubována 15 min při teplotě 70 °C. Poté bylo přidáno 210 µl 96% etanolu, vzorek byl přenesen z mikrozkušavky na kolonku umístěnou v záchytné zkumavce a centrifugován (11 000 g, 2 min). Kolonka byla přenesena do nové záchytné zkumavky, bylo přidáno 500 µl promývacího pufru a směs byla centrifugována (11 000 g, 2 min). Kolonka byla přenesena do nové záchytné zkumavky, bylo přidáno 600 µl pufru 5 a směs byla centrifugována (11 000 g, 2 min). Kolonka byla přenesena do nové záchytné zkumavky a pomocí centrifugace (11 000 g, 2 min) dosušena. Kolonka byla přenesena do nové mikrozkušavky (1,5 ml), bylo přidáno 100 µl předeřátého elučního pufru, směs byla inkubována při pokojové teplotě 1 min a centrifugována (11 000 g, 2 min). Záchytná mikrozkušavka se vzorkem eluované DNA byla označena (název, datum) a následně uložena při -20 °C pro další analýzy (v našem případě pro pyrosekvencování).

3.5.2 Izolace DNA tepelnou lýzou

DNA izolovaná tepelnou lýzou bakteriálních buněk je méně čistá než při použití komerčních souprav, ale pro PCR-HRMA analýzu je dostačující. Genomová DNA byla izolována z čisté kultury kultivované na krevním agaru. Pomocí bakteriální kličky byla odebrána jedna bakteriální kolonie, která byla resuspendována v 50 µl autoklávované destilované vody v mikrozkušavce typu Eppendorf o objemu 1,5 ml. Suspenze byla inkubována 10 min při teplotě 90 °C a třepání 440 rpm v tepelném bloku a následně centrifugována 2 min při 13 000 g. Získaný supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky, která byla označena (název, datum) a následně uložena při -20 °C pro další analýzy.

3.6 PCR s následnou analýzou tání

3.6.1 PCR-HRMA pro identifikaci bakterií

K identifikaci bakterií byla použita PCR s primery odvozenými z 16S rDNA (Tabulka VII). Reakce byla provedena v objemu 15 µl a reakční směs byla připravena podle Tabulky VIII. PCR reakce byla provedena v termocykleru Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad) za podmínek:

počáteční denaturace 95 °C, 10 min

- | | |
|---|------------|
| 1. denaturace 95 °C, 20 s | } 30 cyklů |
| 2. hybridizace primerů (<i>annealing</i>), 53 °C, 30 s | |
| 3. prodlužování primerů (<i>extension</i>), 72 °C, 30 s | |

konečná extenze primerů, 72 °C, 7 min

PCR produkty byly bezprostředně po skončení amplifikace podrobeny analýze tání v rozmezí teplot 75-95 °C. Výsledky analýzy byly graficky zpracovány do podoby derivovaných křivek tání pomocí programového vybavení Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad CFX Manager V1.6.541.1028) v souladu s doporučeními výrobce a následně vyhodnoceny na základě vizuálního porovnání poloh píků v derivovaných křivkách tání.

Tabulka VII: Seznam primerů použitých při PCR

Primer	Sekvence (5' → 3')	Velikost PCR produktu [bp]	Reference
V1f	GYGGCGNACGGGTGAGTA A	81	Yang a kol. (2009)
V1r	TTACCCACCAACTAGC		

Tabulka VIII: Složení reakční směsi pro jednu PCR reakci

Reagencie	Množství [μl]	Počáteční koncentrace	Konečná koncentrace
PCR-H ₂ O	4,4	-	-
PCR-mix	7,5	2x	1x
MgCl ₂	0,9	25 mM	1,5 mM
primer <i>forward</i>	0,1	100 μM	0,7 μM
primer <i>reverse</i>	0,1	100 μM	0,7 μM
DNA templát	2,0	nebylo měřeno	

Poznámka: Byl použit kit LightCycler® 480 High Resolution Melting Master, který obsahuje FastStart Taq DNA polymerázu, pufr, dNTP mix a High ResoLight high-resolution melting dye.

3.6.2 PCR-HRMA pro genomovazaci komplexu *Burkholderia cepacia*

K identifikaci genomovazů komplexu *Burkholderia cepacia* byla použita specifická PCR zacílená na gen *recA* s genomovaz-specifickými primery podle Mahenthiralingam a kol. (2000) (Tabulka IX) s následnou analýzou tání PCR produktů. Reakce byla provedena v objemu 20 μl, reakční směs byla připravena podle Tabulky X a následně převrstvena 20 μl PCR oleje (Top-Bio). PCR reakce byla provedena v termocykleru RotorGene Q (Qiagen) za podmínek:

počáteční denaturace 94 °C, 7 min

- | | |
|---|------------|
| 1. denaturace 94 °C, 30 s | } 40 cyklů |
| 2. hybridizace primerů (<i>annealing</i>), 62 °C, 45 s | |
| 3. prodlužování primerů (<i>extension</i>), 72 °C, 60 s | |

konečná extenze primerů, 72 °C, 7 min

PCR produkty byly bezprostředně po skončení amplifikace podrobeny analýze tání v rozmezí teplot 55-95 °C. Výsledky analýzy byly graficky zpracovány do podoby derivovaných křivek tání pomocí programového vybavení RotorGene Q (Rotor-Gene Q Series Software) v souladu s doporučeními výrobce a následně vyhodnoceny na základě vizuálního porovnání poloh píků v derivovaných křivkách tání.

Tabulka IX: Seznam genomvar-specifických primerů použitých při specifické PCR

Primer	Sekvence (5' → 3')	Genomovar	Velikost PCR produktu [bp]
BCRG11	CAGGTCGTCTCCACGGGT	genomovar I	500
BCRG12	CACGCCGATCTTCATACGA		
BCRBM1	CGGCGTCAACGTGCCGGAT	genomovar II	710
BCRBM2	TCCATCGCCTCGGCTTCGT		
BCRG3A1	GCTCGACGTTCAATATGCC	genomovar III, podtyp A	380
BCRG3A2	TCGAGACGCACCGACGAG		
BCRG3B1	GCTGCAAGTCATCGCTGAA	genomovar III, podtyp B	780
BCRG3B2	TACGCCATCGGGCATGCT		
BCRG41	ACCGGCGAGCAGGCGCTT	genomovar IV	650
BCRG42	ACGCCATCGGGCATGGCA		
BCRBV1	GGGCGACGGCGACGTGAA	genomovar V	380
BCRBV2	TCGGCCTTCGGCACCACT		

Tabulka X: Složení reakční směsi pro jednu PCR reakci

Reagencie	Množství [μl]	Počáteční koncentrace	Konečná koncentrace
PCR-H ₂ O	14,24	-	-
DNA pufr-kompletní	2,0	10x	1x
LCGreen TM Plus+	1,0	10x	0,5x
dNTPs	0,16	25 mM	0,2 mM
primer <i>forward</i>	0,1	100 μM	0,5 μM
primer <i>reverse</i>	0,1	100 μM	0,5 μM
Tag polymeráza	0,4	5 U/μl	0,1 U/μl
DNA templát	2,0	nebylo měřeno	

3.6.3 PCR-HRMA pro určení druhů skupiny *Streptococcus milleri*

3.6.3.1 Real-time PCR-HRMA

K identifikaci členů skupiny *Streptococcus milleri* byla použita PCR zacílená na gen 16S rDNA podle Olson a kol. (2000) (Tabulka XI) s následnou analýzou tání PCR produktů. Reakce byla provedena v objemu 15 µl a reakční směs byla připravena podle Tabulky VIII. PCR reakce byla provedena v termocykleru Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad) za podmínek:

počáteční denaturace 95 °C, 10 min

1. denaturace 95 °C, 10 s
 2. hybridizace primerů (*annealing*), 62 °C, 15 s
 3. prodlužování primerů (*extension*), 72 °C, 15 s
- } 30 cyklů

PCR produkty byly bezprostředně po skončení amplifikace podrobeny analýze tání v rozmezí teplot 80-95 °C. Výsledky analýzy byly graficky zpracovány do podoby derivovaných křivek tání pomocí programového vybavení Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad CFX Manager V1.6.541.1028) v souladu s doporučeními výrobce a následně vyhodnoceny na základě vizuálního porovnání poloh píků v derivovaných křivkách tání.

Tabulka XI: Seznam primerů použitých při real-time PCR

Název primeru	Sekvence (5' → 3')	Velikost PCR produktu [bp]
16S_SA_F	CAAGTAGGACGCACAGTTTA	146
16S_SA_R	TGTGTTACATACTGTTATGCGGT	
16S_SCI_F	AAGTAGAACGCACAGGATG	143
16S_SCI_R	CAGTAAATGTTCTTATGCGGTATTAG	

3.6.3.2 Nested PCR-HRMA

K identifikaci členů skupiny *Streptococcus milleri* byla použita nested PCR zacílená na gen 16S rDNA podle Yamaura a kol. (2005) s následnou analýzou křivky tání PCR produktů. Reakce byla provedena v objemu 15 µl a reakční směs byla připravena podle Tabulky VIII. První PCR reakce byla provedena s primery 27F a 1492R (Tabulka XII) v termocykleru Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad) za podmínek:

počáteční denaturace 95 °C, 10 min

1. denaturace 95 °C, 60 s
2. hybridizace primerů (*annealing*), 55 °C, 60 s
3. prodlužování primerů (*extension*), 72 °C, 90 s

} 35 cyklů

konečná extenze primerů, 72 °C, 10 min

Tabulka XII: Seznam primerů použitých při nested PCR

Primer	Sekvence (5' → 3')	Velikost PCR produktu [bp]
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1 505
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	
SA_F	ATGCAATTGCATCGCTAGT	445
SA_R	GCAGGCTTTGGAAACTGTTTAACT	
SC_F	GTGCAAGAGCATCACTACC	445
SC_R	GCAGGCTTTGGAAACTGTTTAACT	
SI_F	GTGCAAATGCATCACTACC	445
SI_R	GCAGGCTTGGAAACTGTTTAACT	

Druhá reakce byla provedena v objemu 15 µl a reakční směs byla připravena podle Tabulky VIII s použitím PCR produktu první PCR reakce jako templátu a primery SA, SC a SI (Tabulka XII). PCR reakce byla provedena v termocykleru Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad) za podmínek:

počáteční denaturace 95 °C, 10 min

1. denaturace 95 °C, 30 s
2. hybridizace primerů (*annealing*), 58,5 °C, 30 s
3. prodlužování primerů (*extension*), 72 °C, 30 s

} 35 cyklů

PCR produkty byly bezprostředně po skončení amplifikace podrobeny analýze tání v rozmezí teplot 70-90 °C. Výsledky analýzy byly graficky zpracovány do podoby derivovaných křivek tání pomocí programového vybavení Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad CFX

Manager V1.6.541.1028) v souladu s doporučeními výrobce a následně vyhodnoceny na základě vizuálního porovnání poloh píků v derivovaných křivkách tání.

3.6.3.3 Srovnání citlivosti real-time PCR a nested PCR s následnou analýzou tání

Postupy pro real-time PCR (viz 3.7.3.1) a nested PCR (viz 3.7.3.2) byly provedeny s templátovou DNA v podobě koncentrační řady, kdy byla extrahovaná DNA ředěna 10x až 10 000x. Následně byla provedena PCR reakce dle výše uvedeného postupu. Hranice citlivosti byla stanovena na základě přítomnosti specifického píku v derivovaných křivkách tání.

3.7 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza byla použita pro ověření specifity a pro optimalizaci PCR reakcí. Byl připraven 2% agarózový gel o velikosti 12x13 cm. V Erlenmayerově baňce bylo smícháno 2,4 g agarózy, 12 ml 10x TBE pufru a 108 ml destilované vody (dH₂O). Tato směs byla povařena, dokud se agaróza nerozpustila a potom byly přidány 4 µl barviva *GoodView* (*Ecoli*). Směs byla nalita do formy a ponechána při laboratorní teplotě, dokud gel neztuhnul. Ztuhlý gel byl převrstven 1 litrem TBE pufru a do jamek bylo pipetováno 10 µl vzorku smíchaného s 2 µl nanášecího pufru (*DNA loading dye*, Thermo Scientific). Jako marker molekulové hmotnosti byl použit GeneRuler 50 bp DNA ladder (Thermo Scientific). Elektroforéza byla prováděna 30 až 60 min při 80 V. Separované produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru.

3.8 Pyrosekvencování

K identifikaci bakterií pomocí pyrosekvencování byla použita PCR s primery odvozenými z 16S rDNA (Tabulka XIII; Jonasson a kol., 2002). Reakce byla provedena v objemu 25 µl a reakční směs byla připravena podle Tabulky XIV. PCR reakce byla provedena v termocykleru BioRad CFX96 (Bio-Rad) za podmínek:

počáteční denaturace 95 °C, 15 min

1. denaturace 94 °C, 30 s
 2. hybridizace primerů (*annealing*), 56 °C, 30 s
 3. prodlužování primerů (*extension*), 72 °C, 30 s
- } 45 cyklů

konečná extenze primerů, 72 °C, 10 min

Tabulka XIII: Seznam primerů použitých pro amplifikaci před pyrosekvencováním

Primer	Sekvence (5' → 3')	Velikost PCR produktu [bp]
bio-pBR5.SE	GAAGAGTTTGATCATGGCTCAG	115
pBR-V1.AS	TTACTCACCCGTCCGCCACT	

Tabulka XIV: Složení reakční směsi pro jednu PCR reakci

Reagencie	Množství [μl]	Počáteční koncentrace	Konečná koncentrace
RNase-free water	10,3	-	-
PyroMark PCR Master	12,5	2x	1x
primer <i>forward</i>	0,1	100 μM	0,4 μM
primer <i>reverse</i>	0,1	100 μM	0,4 μM
DNA templát	2,0	nebylo měřeno	

Poznámka: Byl použit kit PyroMark PCR kit, který obsahuje HotStarTaq DNA polymerázu, PyroMark Reaction Buffer (3 mM MgCl₂) a dNTPs.

Pyrosekvencování bylo prováděno na platformě PyroMark Q96 ID (Qiagen) podle pokynů výrobce. K 20 μl biotinylovaného PCR produktu bylo přidáno 60 μl mixu (17 μl dH₂O, 40 μl binding pufru a 3 μl *Sepharose beads* s navázaným streptavidinem). Směs byla inkubována při pokojové teplotě a třepání 1 400 rpm po dobu 10 minut pro imobilizaci biotinylovaných PCR produktů na sefárové kuličky díky specifické vazbě streptavidin-biotin. Tento komplex s imobilizovaným PCR produktem byl přečištěn pomocí vakuové pumpy s filtry. Přečištěná imobilizovaná ssDNA byla získána promytím postupně v 70% etanolu, v denaturačním pufru a v promývacím pufru. Na kuličkách imobilizovaná ssDNA byla přidána do jamky se 40 μl sekvenačního primeru (pBR-V1.AS, 0,4 μM v *annealing*

pufru). Destička (96-jamková) byla inkubována při 80 °C po dobu 2 minut a následně se nechala vychladnout na pokojovou teplotu. Do přístroje byla umístěna destička se vzorky i tzv. cartridge obsahující enzymy, substráty a nukleotidy. Software (PyroMark Q96 ID software) byl nastaven v módu SQA s 25 cykly ATCG (Lu a kol., 2011; Jonasson a kol., 2002). Získané sekvence byly přímo použity pro identifikaci pomocí vyhledávání homologních sekvencí v databázi GenBank s využitím nástroje BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.9 Stanovení citlivosti, specifity a výkonu metod

Citlivost identifikační metody (míra správného hodnocení) byla vypočítána jako podíl počtu izolátů, pro které metoda vydala správný výsledek identifikace na úroveň rodu nebo druhu, z celkového počtu izolátů, které byly danou identifikační metodou vyšetřeny.

Specifita identifikační metody (míra vyloučení nesprávného hodnocení) byla vypočítána jako podíl počtu izolátů, u kterých daná metoda správně vyloučila chybnou identifikaci, z celkového počtu izolátů u kterých nějaký výsledek identifikace vydala. Tj. 100% specifita byla dosažena, pokud určitá metoda nevydala žádný chybný výsledek.

Výkon (hloubka identifikace) byla vypočítána jako podíl počtu izolátů, pro které metoda vydala správný výsledek identifikace na úroveň druhu, z celkového počtu izolátů.

4. VÝSLEDKY

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

V rámci období od června 2012 do června 2014 bylo získáno 1140 klinických izolátů (Příloha IV), které byly vykultivovány ze 402 vzorků od 126 pacientů v péči Kliniky plicních nemocí a tuberkulózy (n = 105) a Dětské kliniky (n = 21) Fakultní nemocnice Olomouc trpících bronchiectáziemi, cystickou fibrózou nebo chronickou obstrukční plicní nemocí (Tabulka XV). Získané izoláty byly identifikovány pomocí konvenčních fenotypových metod (viz 3.4), MALDI-TOF MS, pyrosekvencování a PCR-HRMA.

Tabulka XV: Zastoupení klinických izolátů

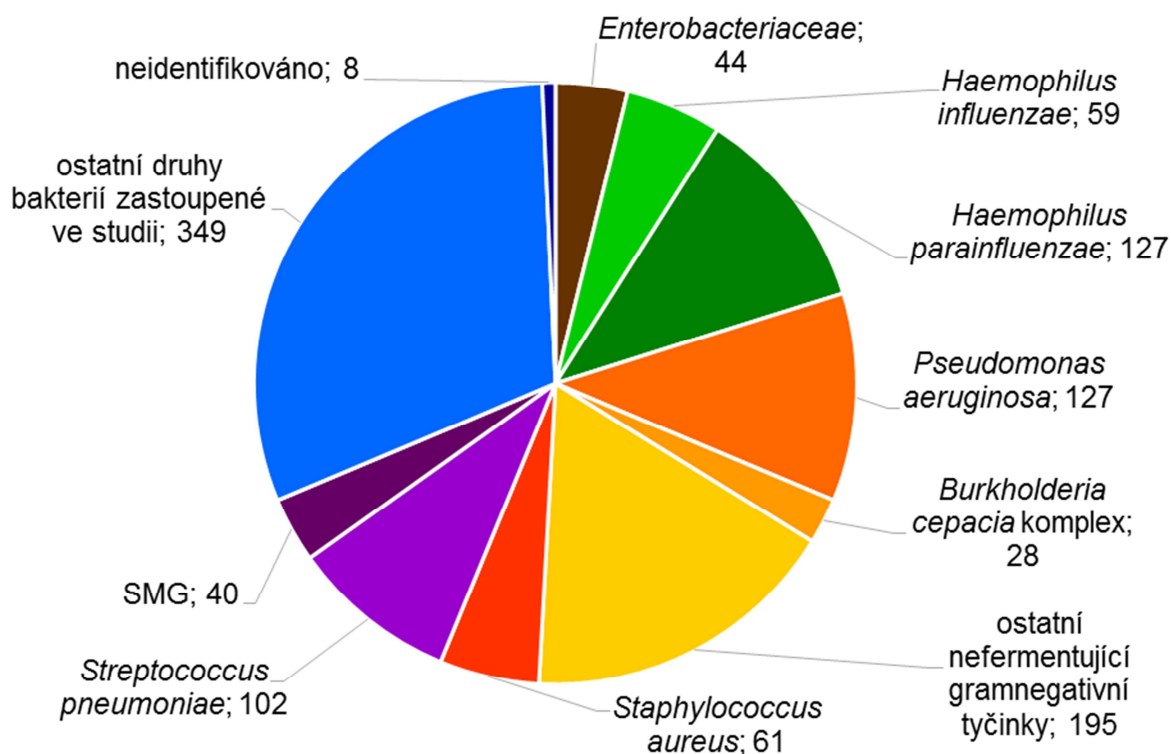
		Diagnóza		
		BE	CF	CHOPN
Dětská klinika	sputum	0	265	0
	stěr/výtěr krk	0	242	0
	stěr/výtěr nos	0	60	0
Plicní klinika	sputum	46	244	405
	stěr/výtěr krk	0	6	0
	stěr/výtěr nos	0	0	0
Celkový počet izolátů		46	817	405

Celkové zastoupení klinicky významných druhů je znázorněno pomocí výšečového grafu (Obrázek 3). Významné rody gramnegativních nefermentujících tyčinek (*Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Moraxella*, *Pseudomonas* a *Stenotrophomonas*) představují celkem 19,6 % (223/1140), přičemž izoláty náležející ke komplexu *Burkholderia cepacia* činily 12,6 % z klinicky významných gramnegativních nefermentujících tyčinek (28/223).

4.1 Srovnání MALDI-TOF MS, pyrosekvencování a PCR-HRMA

Výsledky identifikace MALDI-TOF MS, pyrosekvencování a PCR s následnou analýzou tání PCR produktu (PCR-HRMA) jsou shrnuty v Tabulce XVI. Pomocí pyrosekvencování byly získány sekvence nukleotidů o délce od 9 do 144 nukleotidů s nejčastější délkou čtení 48 nukleotidů. Konečná identifikace byla dána u MALDI-TOF MS

hodnotou skóre. Ze souboru nebylo pomocí použitých metod identifikováno 8 izolátů. Nejvyšší úrovně identifikace izolátů zahrnutých ve studii pomocí MALDI-TOF MS, pyrosekvencování a PCR-HRMA shrnuje Příloha IV.



Obrázek 3: Schéma zastoupení významných druhů ve studii

U aplikovaných metod (MALDI-TOF MS, pyrosekvencování a PCR-HRMA) byla stanovena citlivost, specifita, a výkon (tzv. 'hloubka identifikace') metody (Tabulka XVII). Citlivost byla nejnižší u PCR-HRMA (66,2 %), u metody MALDI-TOF MS byla stanovena na 96,8 % a u pyrosekvencování na 85,1 %.

Specifita MALDI-TOF MS a pyrosekvencování byla 100 %, tedy pokud metoda vydala výsledek, nejednalo se nikdy o chybnou identifikaci. U PCR-HRMA bylo chybně identifikováno 15 izolátů, tj. specifita byla 99,7 %.

Výkon ('hloubka identifikace') metod, tzn. schopnost identifikace na úroveň druhu, byl již velmi rozdílný. MALDI-TOF MS dosáhla identifikace na úroveň druhu u 96,8 %, pyrosekvencování u 43,2 % a PCR-HRMA u 13,6 % izolátů.

Tabulka XVI: Souhrn získaných výsledků identifikace bakterií pomocí MALDI-TOF MS, pyrosekvencování a PCR-HRMA

		Počet izolátů
Celkový počet izolátů zahrnutých ve studii		1140
MALDI-TOF MS	správná identifikace na úroveň druhu	1104
	správná identifikace na úroveň druhu/rodu	1104
	chybná identifikace	0
	neidentifikováno	36
Pyrosekvencování	správná identifikace na úroveň druhu	492
	správná identifikace na úroveň druhu/rodu	970
	správná identifikace na úroveň čeledi, případně skupiny	130
	chybná identifikace	0
	neidentifikováno	40
PCR-HRMA	správná identifikace na úroveň druhu	155
	správná identifikace na úroveň druhu/rodu	755
	správná identifikace na úroveň čeledi, případně skupiny	342
	chybná identifikace	15
	neidentifikováno	28

Tabulka XVII: Vyhodnocení citlivosti, specifity a výkonu použitých metod

Metoda	Citlivost [%]	Specifita [%]	Výkon ('hloubka identifikace') [%]
MALDI-TOF MS	96,8	100	96,8
pyrosekvencování	85,1	100	43,2
PCR-HRMA	66,2	99,7	13,6

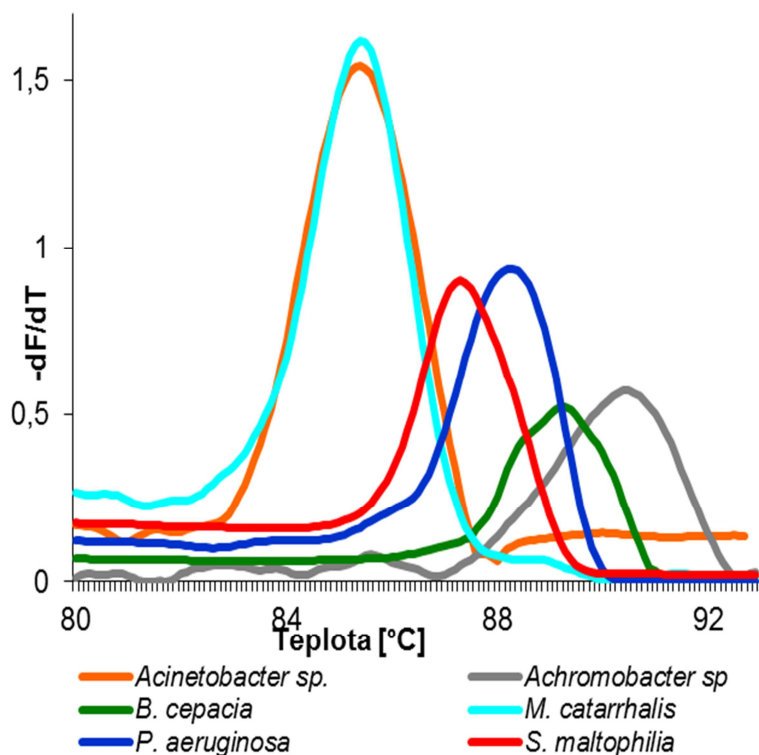
4.2 Využití PCR-HRMA pro identifikaci bakterií se zaměřením na gramnegativní nefermentující tyčinky

Mezi významnější gramnegativní nefermentující tyčinky zastoupené ve studii patří rody *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Moraxella*, *Pseudomonas*

a *Stenotrophomonas*. Obrázky 4 a 5 znázorňují schopnost rozlišení zmíněných rodů pomocí PCR-HRMA s primery pro amplifikaci variabilní oblasti V1 genu 16S rDNA. Druhy *Achromobacter* a *Pseudomonas* bylo možné odlišit přímo na základě výsledků PCR-HRMA. Rod *Acinetobacter* nebylo možné odlišit od rodu *Moraxella*, rod *Burkholderia* nebylo možné odlišit od rodu *Cupriavidus* a rod *Stenotrophomonas* od příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae*. V těchto případech lze aplikovat barvení dle Grama (*Acinetobacter* versus *Moraxella catarrhalis*) nebo biochemické testy. Při barvení dle Grama pozorujeme buňky *Acinetobacter* sp. jako gramnegativní kokotyčinky, zatímco nejčastějšího zástupce rodu *Moraxella*, *M. catarrhalis*, jako gramnegativní diplokoky. Rody *Burkholderia* a *Cupriavidus* lze rozlišit pomocí rychlosti oxidázové reakce, která je u druhů náležejících ke komplexu *Burkholderia cepacia* pomalá, a také na základě detekce beta-galaktosidázové aktivity (ONPG test), který je u burkholderií pozitivní na rozdíl od rodu *Cupriavidus*. Rod *Stenotrophomonas* lze od zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* odlišit na základě oxidázové aktivity.



Obrázek 4: Algoritmus rozlišení gramnegativních nefermentujících tyčinek



Obrázek 5: Reprezentativní křivky významných gramnegativních nefermentujících tyčinek

4.2.1 Rozlišení v rámci rodu *Pseudomonas* pomocí PCR-HRMA

Kromě druhu *Pseudomonas aeruginosa* je možné v klinickém materiálu zachytit i vzácněji se vyskytující druhy, které nejsou v rutinním provozu často podrobně identifikovány a ve výsledku jsou označeny jako *Pseudomonas sp.* Ze srovnání bylo zjištěno, že druh *Pseudomonas aeruginosa* lze odlišit pomocí PCR-HRMA od *P. grimontii*, ale nelze jej odlišit od druhů *P. mendocina* a *P. veronii*.

Při aplikaci MALDI-TOF MS nebo pyrosekvencování je možné druh *P. aeruginosa* spolehlivě odlišit od ostatních druhů zastoupených ve studii (*P. grimontii*, *P. mendocina*, *P. veronii*).

4.3 Rozlišení genomarů komplexu *Burkholderia cepacia*

Páry primerů použité v této části studie byly zaměřeny na gen *recA*, kódující rekombinázu A, která má úlohu při opravě DNA. Tato rekombináza se také účastní SOS reparace u bakterií.

4.3.1 Rozlišení genomarů komplexu *B. cepacia* pomocí fenotypových metod

Všech 28 klinických izolátů a referenční kmeny prokázaly dobrý růst na selektivní půdě pro burkholderie (BCA), čímž byla orientačně potvrzena jejich příslušnost ke komplexu *Burkholderia cepacia*. Na základě morfologie kolonií na krevním agaru (Obrázek 6) nebo selektivní půdě (Obrázek 7) nebylo možné jednotlivé genomovary rozlišit. Při růstu na selektivní půdě BCA docházelo u všech izolátů a referenčních kmenů vlivem indikátoru ke změně barvy půdy z nažloutlé na růžovou.

Z biochemických testů byl použit test pro stanovení aktivity oxidázy (OXItest, PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.), který byl pozitivní u všech izolátů a referenčních kmenů, a komerční souprava RapID NF Plus, která obsahuje sestavu biochemických testů (Příloha II). Ani jeden z použitých fenotypových testů neumožnil identifikaci na úroveň genomarů komplexu *Burkholderia cepacia*, ale byla spolehlivě určena příslušnost k tomuto komplexu.



Obrázek 6: Izolát číslo 234 (*B. cenocepacia*) na krevním agaru

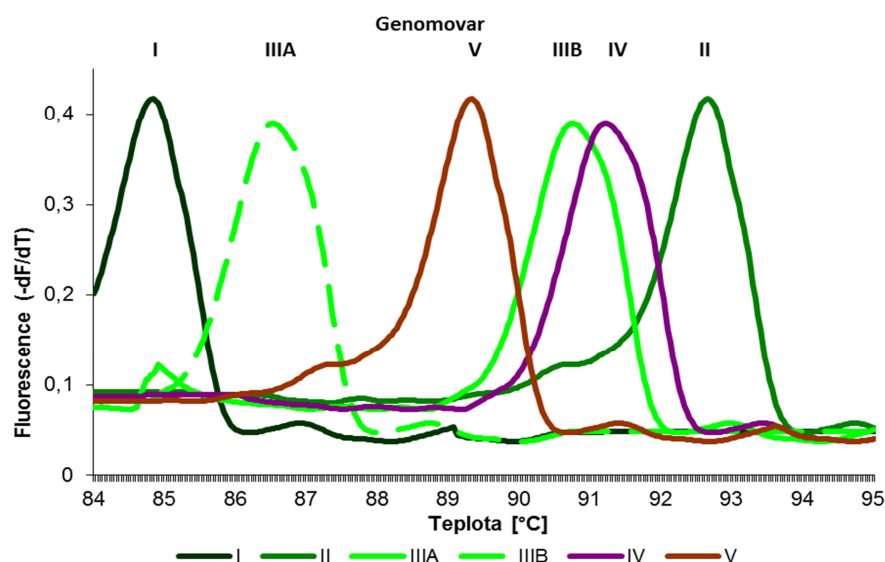


Obrázek 7: Izolát číslo 234 (*B. cenocepacia*) na selektivní půdě (BCA, *Burkholderia cepacia* agar)

4.3.2 Aplikace PCR-HRMA pro genomovariaci komplexu *Burkholderia cepacia*

Referenční kmeny byly identifikovány podle předpokladů, ale nezahrnovaly genomvar III podtyp A, který byl zastoupen zvoleným izolátem z naší studie s dobrými růstovými vlastnostmi a schopností oživení. DNA všech 28 klinických izolátů byla amplifikována pomocí genomvar-specifických primerů převzatých ze studie Mahenthiralingam a kol. (2000). Všechny testované izoláty a referenční kmeny byly identifikovány až na úroveň genomvarů komplexu *Burkholderia cepacia* na základě positivity reakce, tedy přítomnosti píku derivovaných křivek tání (Obrázek 8). Nejpočetněji byl zastoupen genomvar II, kdy 19 izolátů bylo identifikováno jako genomvar II, 8 izolátů jako genomvar III podtyp A a 1 izolát jako genomvar I. Genomvar III bylo možné rozlišit na dva podtypy - A a B.

Pro každý genomvar byla pomocí agarózové elektroforézy určena velikost specifického PCR produktu (Tabulka XVIII) pro validaci PCR-HRMA v identifikaci genomvarů I až V komplexu *Burkholderia cepacia*. U všech vzorků byl získán specifický PCR produkt očekávané velikosti.



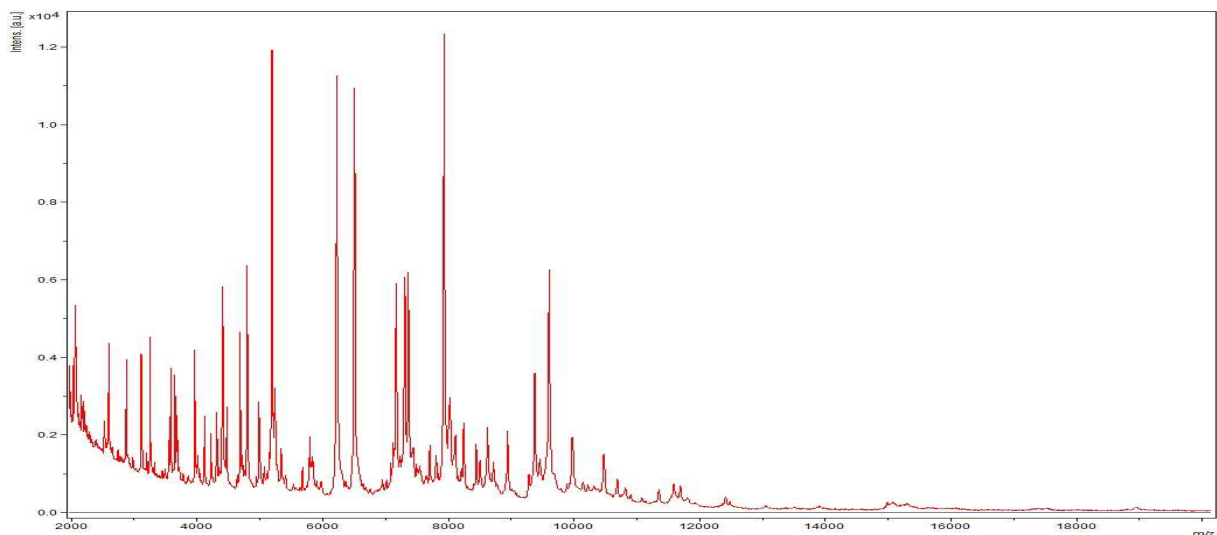
Obrázek 8: Rozlišení genomovarů *Burkholderia cepacia* komplexu pomocí PCR-HRMA, genomovar I je zastoupen izolátem 245, genomovar II izolátem 1388, genomovar III podtyp A izolátem 234, genomovar III podtyp B referenčním kmenem LMG 16656, genomovar IV referenčním kmenem LMG 14294 a genomovar V referenčním kmenem LMG 10929

Tabulka XVIII: Velikost PCR produktů při genomovar-specifické PCR

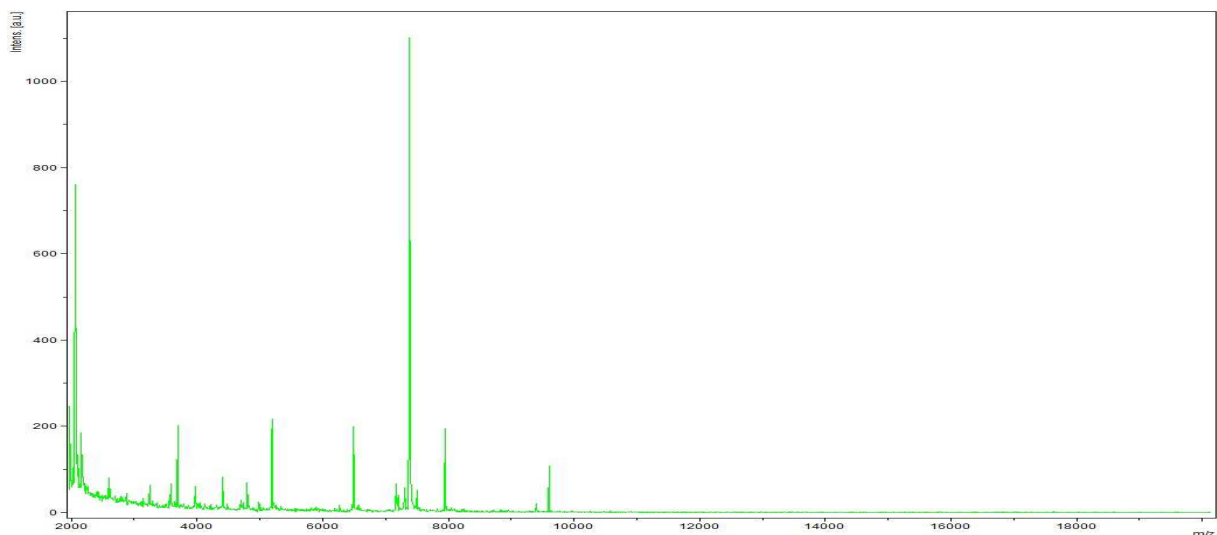
Genomovar		Velikost PCR produktu [bp]
I	<i>B. cepacia</i>	500
II	<i>B. multivorans</i>	710
III podtyp A	<i>B. cenocepacia</i>	380
III podtyp B	<i>B. cenocepacia</i>	780
IV	<i>B. stabilis</i>	650
V	<i>B. vietnamiensis</i>	380

4.3.3 Rozlišení genomovarů komplexu *Burkholderia cepacia* pomocí pyrosekvencování a MALDI-TOF MS

Hlavní nevýhodou pyrosekvencování je krátkost sekvencovaného úseku, což pro účely identifikace mikroorganismů vyžaduje pečlivou volbu vhodného fragmentu DNA pro analýzu. Pyrosekvencování oblasti V1 16S rDNA neumožnilo rozlišení jednotlivých genomovarů komplexu *Burkholderia cepacia* a ani druhů v rámci rodu *Burkholderia* (Obrázky 9 a 10) dle výsledků srovnání získaných sekvencí s databází GenBank, na rozdíl od metody



Obrázek 11: Spektrum významných proteinů u *Burkholderia multivorans*, izolát číslo 1388



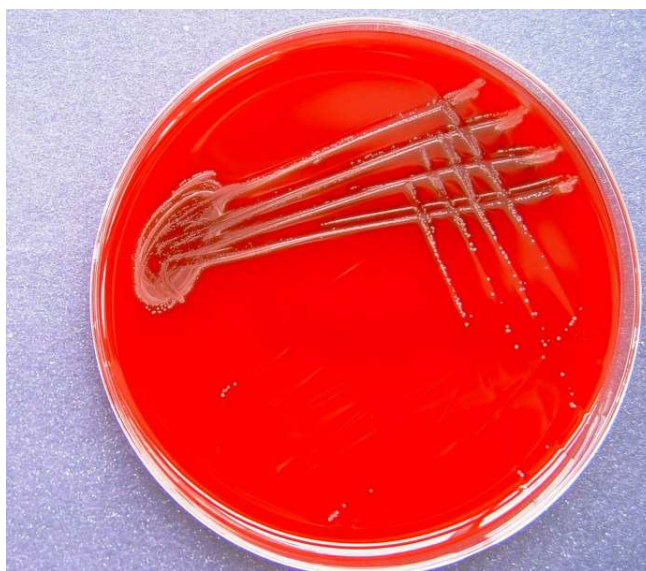
Obrázek 12: Spektrum významných proteinů u *Burkholderia cenocepacia*, izolát číslo 234

4.4 Identifikace druhů skupiny *Streptococcus milleri*

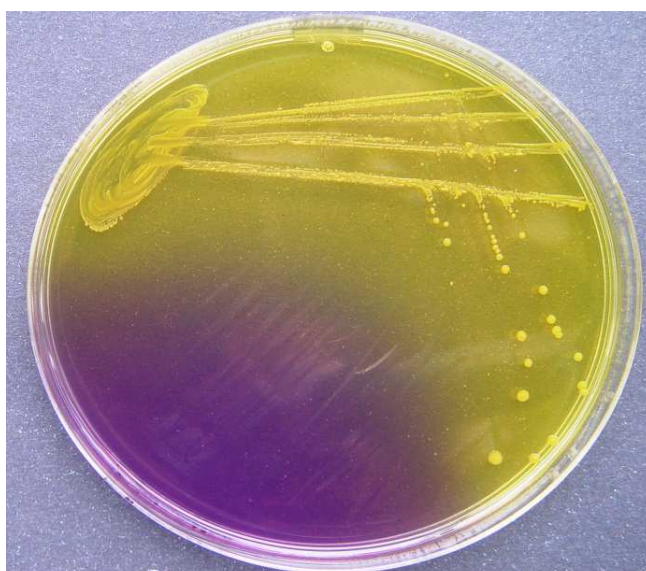
V rámci 1140 izolovaných bakterií bylo detekováno 40 izolátů patřících do skupiny *Streptococcus milleri* (*Streptococcus milleri* group, SMG), tj. 3,5 %. Nejvíce zastoupen byl druh *Streptococcus anginosus* a to 32 izoláty (80 %). Výskyt SMG byl vyšší u pacientů s CF (n = 28; 71,8 %) ve srovnání s pacienty trpícími CHOPN (n = 11; 28,2 %).

4.4.1 Identifikace SMG pomocí fenotypových metod

Pro kultivaci byl použit krevní agar (Obrázek 13) a semi-selektivní McKay agar (Obrázek 14). McKay agar umožnil lepší záchyt SMG při primokultivaci ve srovnání s krevním agarem, zejména proto, že dojde k potlačení růstu většiny ostatních druhů bakterií (mimo *Streptococcus* sp.).



Obrázek 13: Izolát číslo 313 (*S. anginosus*) na krevním agaru



Obrázek 14: Izolát číslo 313 (*S. anginosus*) na McKay agaru

Identifikace byla podpořena biochemickými testy pomocí systému Rapid STR (Remel, Příloha III). Dále byl u izolátů SMG proveden test na aktivitu hyaluronidázy a ONPG test, na krevním agaru byl sledován výskyt hemolýzy a aglutinačně byla provedena klasifikace dle Lancefieldové (Tabulka XIX). Všechny získané izoláty SMG byly citlivé k penicilinu, kdy byly hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC), zjištěné E-testem, v rozmezí 0,016-0,064 µg/ml.

Tabulka XIX: Fenotypové charakteristiky izolátů SMG

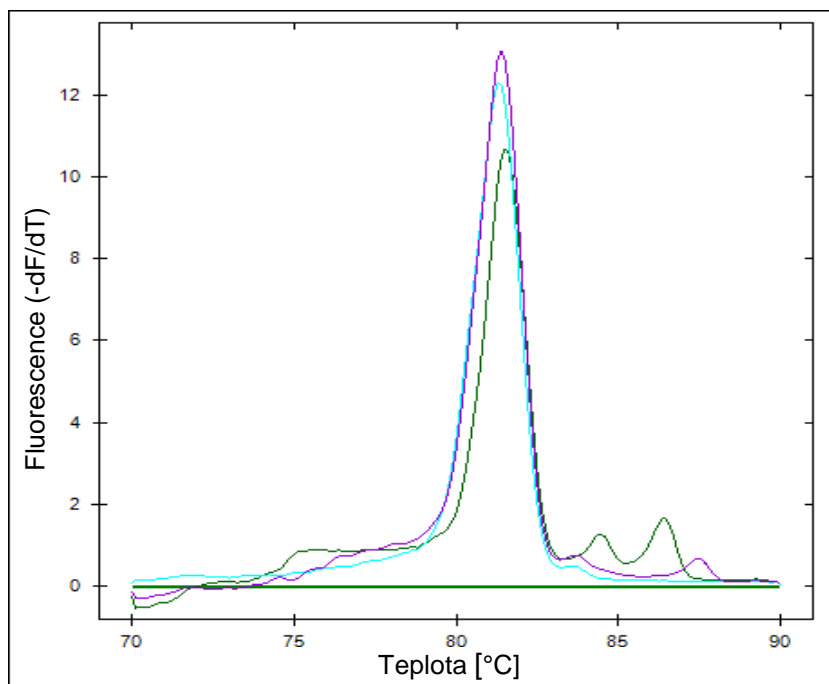
		<i>S. anginosus</i> (n = 32) % (n)	<i>S. constellatus</i> (n = 4) % (n)	<i>S. intermedius</i> (n = 4) % (n)
hyaluronidázová aktivita		0	100	100
β-galaktosidázová aktivita		0	0	100
hemolýza	α (viridace)	40,6 (13)	50 (2)	50 (2)
	β	12,5 (4)	25 (1)	25 (1)
	žádná	46,9 (15)	25 (1)	0
klasifikace dle Lancefieldové	skupina C	34,4 (11)	0	0
	skupina F	62,5 (20)	25 (1)	0
	netyповatelné	3,1 (1)	75 (3)	100

4.4.2 Identifikace SMG pomocí PCR-HRMA

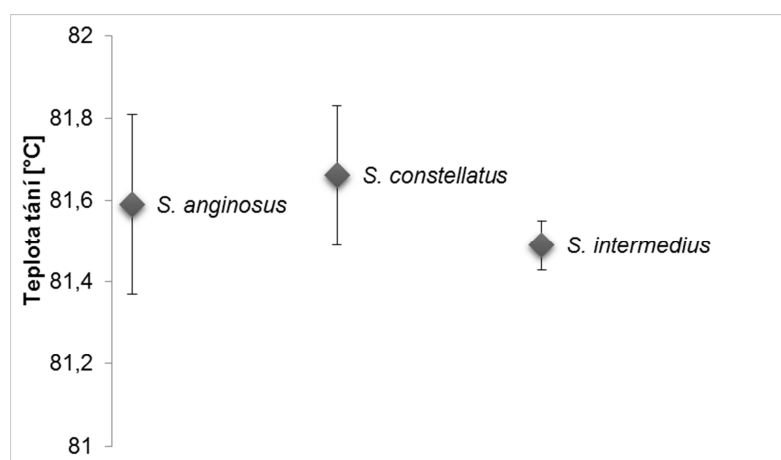
Genotypové metody umožnily spolehlivě odlišit zástupce SMG od ostatních bakteriálních druhů.

4.4.2.1 Identifikace SMG pomocí real-time PCR

Pro real-time PCR byly převzaty primery ze studie Olson a kol. (2010). Amplifikační křivky druhů skupiny SMG se typicky objevovaly mezi desátým až patnáctým cyklem, zatímco amplifikační křivky jiných druhů streptokoků (*S. agalactiae*, *S. gordonii*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius* a *S. sanguinis*) až po 30. cyklu. DNA vybraných druhů mimo rod *Streptococcus* neposkytovaly žádný pozitivní výsledek amplifikace. Křivky tání PCR produktů byly u všech zástupců SMG prakticky shodné, s teplotou tání 81,58 ± 0,25 °C (Obrázky 15 a 16).



Obrázek 15: Reprezentativní křivky zástupců SMG při aplikaci real-time PCR-HRMA; ~*S. anginosus*, ~*S. constellatus* a ~*S. intermedius*

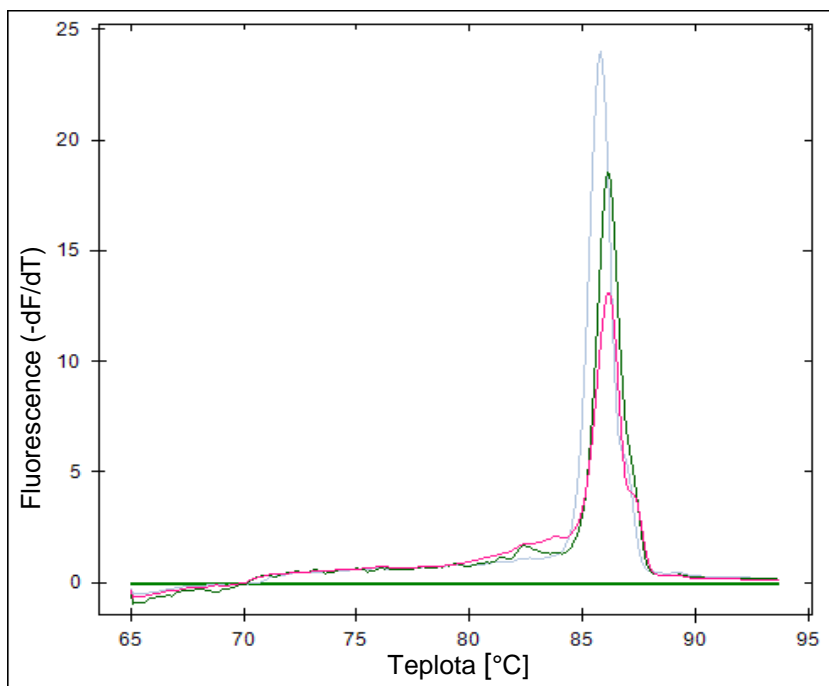


Obrázek 16: Graf hodnot teplot tání SMG u real-time PCR-HRMA

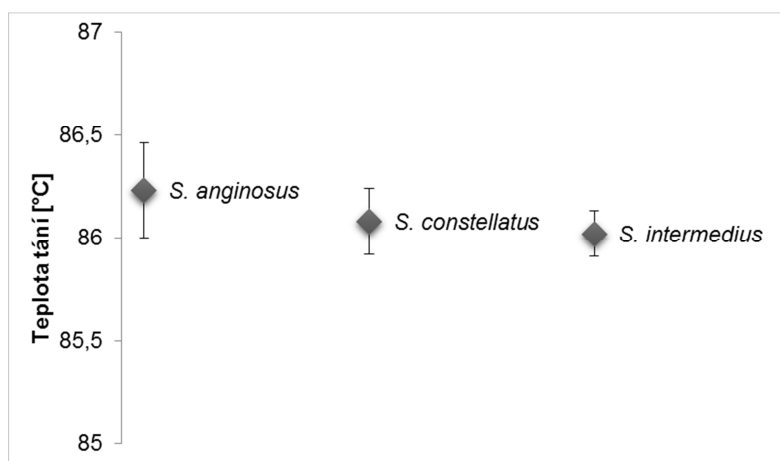
4.4.2.2 Identifikace SMG pomocí nested PCR

Při použití nested PCR (Yamaura a kol., 2005) byl pozorován pozitivní výsledek amplifikace s primárními primery (1. kolo PCR) u všech testovaných druhů, ale ve 2. kole (‘nested’ reakce) byla amplifikována jen DNA druhů skupiny SMG. Křivky tání byly pro

všechny tři druhy SMG opět prakticky shodné, s teplotou tání $86,18 \pm 0,25$ °C (Obrázek 17 a 18), ale protože ve 2. kole byly použity tři páry specifických primerů pro jednotlivé druhy SMG, umožňovala nested PCR rozlišení druhů SMG jen na základě výsledků PCR-HRMA (v jednoduchém provedení).



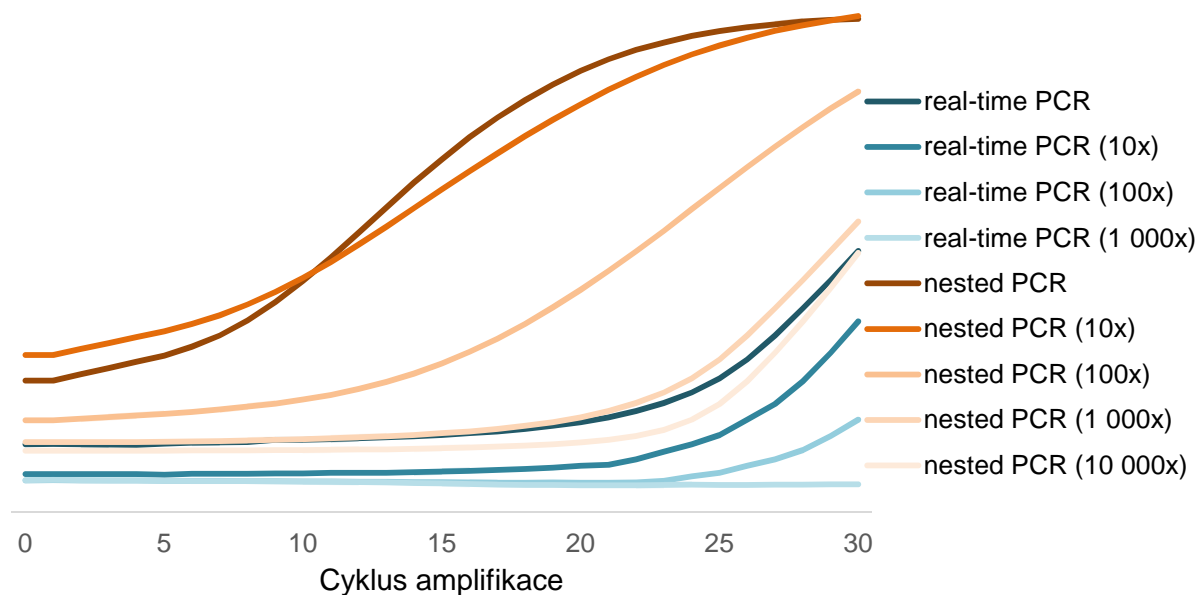
Obrázek 17: Reprezentativní křivky zástupců SMG při aplikaci nested PCR-HRMA; ~*S. anginosus*, ~*S. constellatus* a ~*S. intermedius*



Obrázek 18: Graf hodnot teplot tání SMG u nested PCR

4.4.2.3 Srovnání citlivosti real-time PCR a nested PCR

Citlivost real-time PCR a nested PCR byla zjišťována pomocí ředící řady templátové DNA pro jednotlivé druhy SMG. Testování bylo provedeno ve dvojnásobném opakování. Podle očekávání, nested PCR-HRMA byla citlivější než real-time, a to 100x (Obrázek 19). Real-time PCR byla schopna detekovat maximálně 100x ředěnou DNA, nested PCR až 10 000x.



Obrázek 19: Reprezentativní amplifikační křivky SMG pro real-time PCR a nested PCR

5. DISKUSE

Předložená doktorská disertační práce je zaměřená na posouzení použitelnosti různých variant PCR-HRMA v: (1) identifikaci bakterií se zaměřením na nefermentující gramnegativní tyčinky, (2) rozlišení genomvarů komplexu *Burkholderia cepacia* a (3) identifikaci druhů skupiny *Streptococcus milleri*.

První část práce se zabývala identifikací bakterií, hlavně gramnegativních nefermentujících tyčinek, pomocí MALDI-TOF MS a genotypových metod, které byly zaměřeny na analýzu 16S rDNA, konkrétně hypervariabilní oblasti V1, zastoupených PCR s následnou analýzou tání PCR produktu (PCR-HRMA) a pyrosekvencováním. Oblast V1 byla vybrána na základě předchozí studie, která se zabývala srovnáním výsledků identifikace pomocí PCR-HRMA, kdy byly pro amplifikaci použity primery F+R, V1, V3 a V6, které amplifikovaly hypervariabilní oblasti V1, V3 a V6 16S rDNA. Pár primerů označený F+R amplifikoval úsek 16S rDNA zahrnující oblasti V1 až V3. V této předchozí studii byla právě oblast V1 vyhodnocena jako nejvhodnější pro identifikaci bakterií pomocí PCR-HRMA.

U aplikovaných metod (MALDI-TOF MS, pyrosekvencování a PCR-HRMA) byla stanovena citlivost, specifita a výkon (tzv. 'hloubka identifikace'). Citlivost byla nejnižší u PCR-HRMA (66,2 %), u MALDI-TOF MS byla 96,8 % a u pyrosekvencování 85,1 %. Ke snížení citlivosti u pyrosekvencování a PCR-HRMA došlo vlivem toho, že některé izoláty nebyly identifikovány na úroveň druhu nebo rodu, ale do vyšší taxonomické jednotky, případně uměle vytvořené skupiny, kdy byl výsledek vyhodnocen jako nedostačující.

Výkon ('hloubka identifikace') metod, tzn. schopnost identifikace na úroveň druhu, byl již velmi rozdílný. MALDI-TOF MS dosáhlo identifikace na úroveň druhu u 96,8 %, pyrosekvencování u 43,2 % a PCR-HRMA u 13,6 % izolátů. Je zřejmé, že variabilita oblasti V1 genu 16S rDNA, není dostatečná k identifikaci širokého rozmezí bakteriálních druhů.

Gramnegativní nefermentující tyčinky (*Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* a *Stenotrophomonas*) bylo možné pomocí PCR-HRMA odlišit až na dvě dvojice a to dvojici *Acinetobacter* sp. a *Moraxella cattarhalis* a dvojici *Burkholderia* sp. a *Cupriavidus* sp. Druh *Stenotrophomonas maltophilia* nebylo možné odlišit od čeledi *Enterobacteriaceae*, ale od ostatních druhů zastoupených ve studii bylo možné gramnegativní nefermentující tyčinky odlišit.

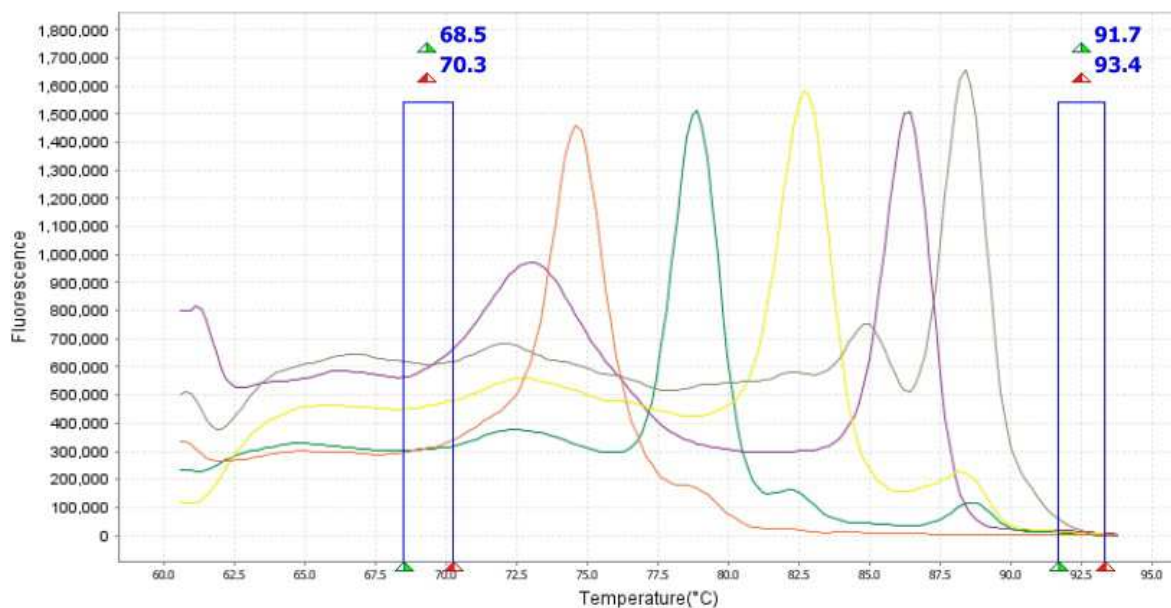
Skutečnost, že jednotlivé druhy bakterií uvnitř čeledi *Enterobacteriaceae* nebylo možné rozlišit pomocí námi testované metody PCR-HRMA zacílené na variabilní oblast V1

genu 16S rDNA, není překvapivá, protože enterobakterie jsou evolučně velmi blíže příbuzné. Pro jejich genetické rozlišení by bylo pravděpodobně nutné se zaměřit cíleně na některé geny sekvenčně dostatečně variabilní v rámci této čeledi, jako ve studii Anbazhagan a kol. (2010), kdy bylo dosaženo rozlišení druhů v rámci čeledi *Enterobacteriaceae* pomocí použití multiplex PCR s následnou analýzou tání. Multiplex PCR zde byla realizována se třemi páry primerů ve dvou setech. Primery v rámci prvního setu byly zaměřeny na geny *uidA* (*E. coli*), *ntxA* (*K. pneumoniae*) a *tuf* (*P. mirabilis*), a v rámci druhého setu na geny 16S rDNA (*Citrobacter* sp.), *atpD* (*E. cloacae*) a *viaB* (*S. typhi*). Pomocí takto navržené multiplex PCR-HRMA bylo možné rozlišit *Citrobacter* sp., *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* a *Salmonella typhi*.

Fakt, že nebylo možné rozlišení na úroveň druhů v rámci čeledi *Enterobacteriaceae* pomocí PCR-HRMA, je částečně v rozporu s výsledky prezentovanými ve studii Yang a kol. (2009), kde použili tři paralelní PCR reakce s primery amplifikujícími variabilní oblasti V1, V3 a V6 16S rDNA. Identifikace byla potom prováděna na základě kódu, který byl přidělován podle výsledku amplifikace. Tato nesrovnalost může být zapříčiněna použitím rozdílného přístrojového vybavení pro HRMA, kdy jsme používali Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad) a Yang a kol. (2009) používali LightScanner (Idaho Technology). Možností neshodných výsledků při použití rozdílných přístrojů pro HRMA, případně různých interkalačních barviv, se zabývala studie Hermann a kol. (2006).

Aplikací PCR-HRMA s použitím druhově-specifických primerů se zabývala také studie Wong a kol. (2014), kde použili multiplex PCR-HRMA pro identifikaci bakterií. Primery byly odvozené z pěti genů – *gltA* (*Acinetobacter baumannii*), *uidA* (*Escherichia coli*), *khe* (*Klebsiella pneumoniae*), *oprL* (*Pseudomonas aeruginosa*) a *mecA* (meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, MRSA). Identifikace byla potom založena na přítomnosti specifického píku (Obrázek 20).

Z poznatků a studií citovaných v literárním přehledu vyplývá, že analýza tání s vysokým rozlišením je použitelná k detekci a identifikaci klinicky významných druhů bakterií (Chakravorty a kol., 2010; Merchant-Patel a kol., 2010; Yang a kol., 2009; Chakravorty a kol., 2007; Cheng a kol., 2006; Skow a kol., 2005 a Klaschik a kol., 2004), kvasinek (Nemcova a kol., 2015; Costa a kol., 2010; Trtková a kol., 2009; Bergman a kol., 2007 a Plachý a kol., 2005) a virů (Epsy a kol., 2006) a dále ve specifických aplikacích jako je genotypizace a mutační skenování.



Obrázek 20: Derivované křivky tání HRM ampliconů

Převzato z Wong a kol., 2014.

Kromě PCR-HRMA byla pro identifikaci izolátů také použita metoda hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS) a pyrosekvencování. Technika MALDI-TOF MS se ukázala jako perspektivní pro identifikaci bakterií. Naopak pyrosekvencování se neukázalo vhodnou metodou pro identifikaci širokého spektra bakterií. Na druhé straně, v důsledku rozsáhlé databáze sekvencí (GenBank), se pyrosekvencování jeví vhodnou metodou pro identifikaci vzácných druhů, které dosud nejsou zahrnuty v databázi MALDI-TOF MS. Například, metoda MALDI-TOF MS zcela selhala v identifikaci druhu *Asaia bogorensis*, který byl úspěšně a jednoznačně identifikován pomocí pyrosekvencování. Nevýhodou pyrosekvencování je neschopnost rozlišit i jinak nepříbuzné rody, např. neumožnilo mezi sebou rozlišit rody *Agregatibacter* a *Proteus* a druhy *Haemophilus haemolyticus* a *H. influenzae*.

Nízká přesnost identifikace pomocí pyrosekvencování je z obecného pohledu překvapivá, ale koreluje s výsledky jiných studií, např. Tewari a kol. (2011) a Jonasson a kol. (2002). Ve studii Tewari a kol. (2011) použili pro identifikaci 54 bakteriálních izolátů pyrosekvencování a Sangerovo sekvencování oblastí V1 a V3 16S rDNA. Pyrosekvencování umožnilo identifikaci 80 % izolátů na úroveň rodu a 43 % na úroveň druhu, což odpovídá našim výsledkům, oproti tomu Sangerovo sekvencování umožnilo identifikaci 100 % izolátů na úroveň rodu a 87 % izolátů na úroveň druhu (Tabulka XX).

Tabulka XX: Srovnání výsledků identifikace bakterií pyrosequencováním v prezentované studii a pyrosequencováním a Sangerovým sekvencováním (500 bp) ve studii Tewari a kol., 2011

Druh	Sangerovo sekvencování (Tewari a kol., 2011)	Pyrosequencování (Tewari a kol., 2011)	Pyrosequencování (naše studie)
<i>Actinobacillus equuli</i>	druh	rod	ND
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	druh	rod	ND
<i>Actinobacillus seminis</i>	druh	druh	ND
<i>Aeromonas</i> sp.	rod	neidentifikováno	ND
<i>Arcanobacterium pluranimalium</i>	druh	neidentifikováno	ND
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	druh	druh	ND
<i>Bacillus anthracis</i>	rod	rod	ND
<i>Bacillus licheniformis</i>	druh	rod	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	rod	rod	ND
<i>Bordetella avium</i>	druh	vyšší taxon	ND
<i>Brucella abortus</i>	rod	rod	ND
<i>Campylobacter fetus</i>	druh	druh	ND
<i>Campylobacter jejuni</i>	rod	rod	ND
<i>Clostridium colicanis</i>	druh	druh	ND
<i>Clostridium septicum</i>	druh	druh	ND
<i>Clostridium sordellii</i>	druh	druh	ND
<i>Clostridium sporogenes</i>	druh	rod	ND
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	druh	druh	ND
<i>Dermatophilus congolensis</i>	druh	vyšší taxon	ND
<i>Enterobacter aerogenes</i>	druh	vyšší taxon	vyšší taxon
<i>Enterococcus cecorum</i>	druh	druh	ND
<i>Escherichia coli</i>	druh	vyšší taxon	
<i>Gallibacterium anatis</i>	druh	druh	ND
<i>Histophilus somni</i>	druh	druh	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	druh	vyšší taxon	vyšší taxon
<i>Bordetella avium</i>	druh	vyšší taxon	ND
<i>Brucella abortus</i>	rod	rod	ND
<i>Moraxela bovoculi</i>	druh	druh	ND
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	druh	rod	ND
<i>Mycoplasma corogypsi</i>	druh	druh	ND
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	druh	rod	ND

Tabulka XX: Srovnání výsledků identifikace bakterií pyrosekvencováním v prezentované studii a pyrosekvencováním a Sangerovým sekvencováním (500 bp) ve studii Tewari a kol., 2011 – pokračování

Druh	Sangerovo sekvencování (Tewari a kol., 2011)	Pyrosekvencování (Tewari a kol., 2011)	Pyrosekvencování (naše studie)
<i>Mycoplasma synoviae</i>	druh	druh	ND
<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	druh	druh	ND
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	druh	rod	ND
<i>Pasteurella multocida</i>	druh	rod	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	druh	rod	druh
<i>Reinibacterium salmonarium</i>	druh	druh	ND
<i>Rhodococcus equi</i>	druh	druh	ND
<i>Riemerella anatipestifer</i>	druh	druh	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	druh	druh	druh
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	druh	rod	druh
<i>Streptococcus bovis</i>	druh	rod	ND
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	druh	druh	rod
<i>Streptococcus equi</i>	druh	druh	ND
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	druh	rod	rod
<i>Streptomyces</i> sp. (griseus – naše studie)	rod	rod	druh
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	rod	vyšší taxon	ND
<i>Yersinia enterocolitica</i>	druh	rod	ND

Poznámka: ND ~ no data, druh nebyl zahrnut v naší studii

Ve studii Jonasson a kol. (2002) autoři uvádějí, že pyrosekvencování je zajímavou aplikací v oblasti diagnostické mikrobiologie pro rychlou detekci a charakterizaci patogenů, zejména grampozitivních bakterií rodů *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus* a gramnegativních bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a rodů *Haemophilus* a *Pseudomonas*. Ve studii se zaměřili na variabilní oblast V1 (Obrázek 21) a V3 16S rDNA.

First 10 bases using pBR-VLAS	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus CoNS</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium</i> spp.	<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Yersinia</i> spp.	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Serratia</i> spp.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Shigella</i> spp.	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.					
AACATCAGAG	28																																					28		
AACGTCAAAG		26																																				26		
AACGTCAGAG			25																																			25		
AACTTTGGAA				2																																		2		
AAGATCAGTA					4																																	4		
AAGTATCAGA						4																																4		
AATCCTTCCG							2																															2		
AGATTTGTTC								4																														4		
CAAGTCCGAA									2																													2		
CATCAGTCTA										25																												25		
CATCCAGAGA											30																											30		
CCTCTTTCCA												25																										25		
CCTCTTTTTC													16																									16		
CCTTGAACCG														26																								26		
CGCCACCCAA															4																							4		
CGCCACCCGA																8																						8		
CGCCGGCAAA																	6																					6		
CGTCACCCAA																		5																				5		
CGTCACCCAG																																							3	
CGTCACCCGA																																							3	
CGTCAGCAAA																																							52	
CGTCAGCAAG																																							51	
CGTCAGCAGA																																							58	
CGTCAGCGAA																																							12	
CGTCATCAAA																																							21	
CTCAAGAGAA																																							1	
CTTTCTTCGG																																							1	
GAATCCAGGA																																							2	
																																								30
																																							4	
																																							34	

Obrázek 21: Výsledek identifikace bakterií na základě prvních 10 bází

Převzato z Jonasson a kol., 2002.

Pokud se zaměříme na oblast V1, tak stafylokoky a enterokoky bylo možné identifikovat na úroveň druhu, což potvrzuje i naše studie. Identifikace v rámci rodu *Streptococcus* je komplikovaná. Jonasson a kol. (2002) měli ve zmiňované studii zastoupeno užší spektrum druhů streptokoků, než bylo zařazeno v naší studii. Izoláty zahrnuté ve studii byly identifikovány jako *Streptococcus pyogenes* (skupina A), který bývá příčinou zánětu hltanu a toxického šoku, *Streptococcus agalactiae* (skupina B), způsobující neonatální infekce, a *Streptococcus pneumoniae*, způsobující zánět středního ucha a zápal plic.

Zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella* sp. a *Enterobacter cloacae*) byli identifikováni v rámci studie

Jonasson a kol. (2002) pouze předběžně, ne jednoznačně. Rody *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* a *Citrobacter* jsou úzce příbuzné, což se odráží i ve výsledcích analýzy 16S rDNA. V rámci zmíněné studie byla také pozorována podobnost, shodně jako v naší studii, mezi druhy *Proteus mirabilis* a *Haemophilus influenzae*. V tomto případě dosáhli Jonasson a kol. (2002) lepších výsledků při analýze oblasti V3 genu 16S rDNA.

Stejnou metodiku aplikovali také Motoshima a kol. (2012), kdy pro identifikaci použili výsledky pyrosekvencování oblastí V1, V3 nebo kombinace V1+V3 16S rDNA. Nejméně vhodná se zde zdála pro analýzu 16S rDNA oblast V1 a nejvíce V3, případně kombinace výsledků z analýzy obou oblastí, V1 i V3.

Účinnost druhové identifikace by u pyrosekvencování bylo možné zvýšit sekvencováním dalších hypervariabilních úseků, to by ale vedlo k vyšším nákladům a technika by ztratila konkurenceschopnost. Naproti tomu MALDI-TOF MS u našeho souboru izolátů nedokázala vydat žádný výsledek identifikace u některých vzácných bakterií z prostředí nebo neobvyklých kmenů běžných bakterií, které bylo možné díky rozsáhlé databázi sekvencí v GenBank identifikovat pomocí pyrosekvencování (*Asaia bogorensis*, *Variovorax* sp., jeden izolát *Staphylococcus pasteurii*, jeden izolát *Pseudomonas aeruginosa* a 6 ze 13 izolátů *Granulicatella adiacens*). Pyrosekvencování proto může sloužit jako alternativa MALDI-TOF MS v případě jejího selhání, aniž by bylo nutné provádět kompletní sekvencování Sangerovou technikou.

Druhá část naší studie se zabývala určením genomovarů komplexu *Burkholderia cepacia*, konkrétně genomovarů I, II, III, IV a V, neboli *B. cepacia* sensu stricto, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis* a *B. vietnamiensis*, které se celosvětově ze zmíněného komplexu nejčastěji vyskytují jako oportunní lidské patogeny. Pro referenční určení genomovaru byla použita PCR analýza genu *recA* (genomovar-specifická PCR) a dále byla testována vypovídací schopnost konvenčních fenotypových metod, pyrosekvencování a MALDI-TOF MS. V rámci této části bylo analyzováno 28 klinických izolátů identifikovaných pomocí konvenčních fenotypových metod jako příslušníci komplexu *Burkholderia cepacia*. Konvenční fenotypové metody, podle očekávání, rozlišení genomovarů komplexu *Burkholderia cepacia* neumožnily a pyrosekvencování variabilní oblasti V1 genu 16S rDNA také ne. Zbýlé aplikované metody, PCR-HRMA genu *recA* a MALDI-TOF MS, rozlišení genomovarů umožnily. Získané výsledky specifické PCR korelují s výsledky prezentovanými ve studiích Whitby a kol. (2000) a Mahenthiralingam a kol. (2000).

Genomovary II (19 izolátů), III podtyp A (8 izolátů) a genomvar I (1 izolát), vyskytující se ve studovaném souboru, nejčastěji způsobují komplikace u infikovaných pacientů (výskyt antibiotické rezistence, 'cepacia syndrom'). Genomovary I, III podtyp B, IV a V se vyskytují méně často a při testování byly v naší studii zastoupeny referenčními kmeny. V našem souboru 126 pacientů trpících chronickým onemocněním plic, bylo 7 pacientů trpících CF a 1 s CHOPN infikováno genomvarem II nebo III podtyp A komplexu *Burkholderia cepacia*.

Ve studii Dřevínka a kol. (2002) byly analyzovány vzorky sputa od 134 pacientů z Centra cystické fibrózy při Fakultní nemocnici v Motole v Praze. Na přítomnost komplexu *Burkholderia cepacia* bylo pozitivních 67 pacientů (62 na genomvar III podtyp A, 3 na genomvar III podtyp B a 2 na genomvar II). Zastoupení genomvarů ve Fakultní nemocnici Olomouc a Fakultní nemocnici v Motole potvrzuje nejčastější výskyt genomvarů II a III podtyp A, ale poukazuje na jejich rozdílné zastoupení, kdy pacienti z Fakultní nemocnice Olomouc byli častěji kolonizováni genomvarem II a pacienti z Fakultní nemocnice v Motole genomvarem III podtyp A. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben přítomností epidemického klonu genomvaru II (*B. multivorans*) v nemocničním prostředí, jak bylo již popsáno (Hanulík a kol., 2013).

Genomovary I, III podtyp B, genomvar IV a V se vyskytují vzácně, a nebyly tedy ve studii dostatečně zastoupeny. U genomvaru III podtyp B a IV proto nelze s jistotou tvrdit, že posun píků derivovaných křivek tání při specifické multiplex PCR s následnou analýzou křivkou tání je pro jejich rozlišení dostatečný. Z tohoto důvodu je v tomto případě při podezření na přítomnost genomvaru III podtyp B nebo IV vhodnější provést analýzu PCR produktů pomocí elektroforézy, která již umožňuje spolehlivé rozlišení těchto dvou genomvarů na základě velikosti PCR produktů. Gelová elektroforéza naopak na rozdíl od PCR-HRMA není kvůli shodné velikosti PCR produktů schopna rozlišit genomvar III podtyp A od genomvaru V.

V současné době se pro rozlišení genomvarů I až V komplexu *Burkholderia cepacia* používá specifická PCR s primery navrženými na sekvenci genu *recA*, ale v posledních letech se prosazuje také MALDI-TOF MS (Fehlberg a kol., 2013; Hanulík a kol., 2013). Námi navržená PCR-HRMA metoda prokázala schopnost velmi dobře rozlišit klinicky nejvýznamnější genomovary rychlým a spolehlivým způsobem.

Třetí část naší studie se zabývala identifikací druhů skupiny *Streptococcus milleri* (*Streptococcus milleri* group, SMG). Rutinní detekce SMG ve vzorcích z dýchacích cest je

omezená, protože jejich morfologické charakteristiky často neumožňují odlišení od viridujících streptokoků. Proto byly vyvinuty semi-selektivní půdy pro izolaci druhů této skupiny a to NAS agar (Waite a kol., 2011) a McKay agar (Sibley a kol., 2010), který jsme pro záchyt SMG použili v naší studii.

Pro rozlišení členů skupiny *Streptococcus milleri* byla použita real-time PCR a nested PCR. V obou případech byly PCR produkty podrobeny analýze tání. Námi aplikovaný systém real-time PCR byl převzat ze studie Olson a kol. (2010), kde byly navrženy primery a sondy specifické pro *Streptococcus anginosus* a potom pro dvojici *Streptococcus constellatus/intermedius*. V naší modifikaci jsme pro posouzení možného budoucího použití v rutinním provozu systém testovali z ekonomických důvodů bez použití sond. U obou testovaných systémů – real-time PCR i nested PCR – nebyly zjištěny problémy se specifitou detekce SMG. Nested PCR ale prokázala schopnost spolehlivě odlišit jednotlivé druhy za nižších nákladů (u real-time je to možné při použití nákladných sond) a s vyšší citlivostí. V rutinním použití pak může naopak nevýhodou nested PCR být vyšší náchylnost ke křížové kontaminaci a větší nároky na provozní čas termocykleru a na práci.

Do skupiny *Streptococcus milleri* bylo zařazeno 40 izolátů získaných ze vzorků od našeho souboru pacientů s CF a CHOPN. Tyto izoláty byly identifikovány v první řadě na základě výsledků MALDI-TOF MS a tato identifikace byla ještě následně podpořena biochemickými testy. V našem souboru 126 pacientů trpících chronickým onemocněním plic, bylo 39 pacientů infikováno SMG. Výskyt SMG byl vyšší u pacientů trpících CF (28/39; 71,8 %) ve srovnání s pacienty trpícími CHOPN (11/39; 28,2 %). Všechny získané izoláty SMG byly citlivé k penicilinu, což koresponduje s 94,4 % citlivými izoláty ze 180 izolátů získaných z klinických vzorků v rámci studie Limia a kol. 1999.

6. ZÁVĚRY

Předkládaná doktorská disertační práce splnila zadané cíle:

1. Bylo shromážděno 1140 primárních izolátů bakterií ze 402 klinických vzorků od 126 pacientů s vybranou skupinou diagnóz (bronchiektáziemi, cystickou fibrózou a chronickou obstrukční plicní nemocí), které byly uloženy do sbírky klinických izolátů bakterií Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc.
2. U získaných izolátů byly shromážděny výsledky základní konvenční rutinní identifikace, které byly průběžně konfrontovány s výsledky identifikace pomocí MALDI-TOF MS, PCR-HRMA a pyrosekvencování. Parametry jednotlivých metod byly srovnány pro jednotlivé oblasti aplikace.

Ze získaných výsledků lze vyvodit:

1. Nejméně citlivou a specifickou metodou identifikace a zároveň metodou s nejnižší hodnotou hloubky identifikace byla PCR-HRMA. MALDI-TOF MS a pyrosekvencování dosahovaly vysoké citlivosti a specifity. Hloubka identifikace byla u MALDI-TOF MS 96,8 % a u pyrosekvencování 43,2 %. Pro rutinní použití je proto nepochybně metodou volby MALDI-TOF MS s tím, že u izolátů vzácných druhů, které dosud nejsou zastoupeny v databázi proteinových profilů, je pyrosekvencování vhodnou alternativní technikou, která v mnoha případech poskytne spolehlivý výsledek při nákladech nižších než konvenční Sangerova metoda sekvencování.
2. Technika PCR-HRMA má potenciál pro identifikaci nefermentujících gramnegativních bakterií, kdy umožní odlišit tuto skupinu bakterií od ostatních, a také spolehlivě identifikuje rod *Pseudomonas* sp.

3. PCR-HRMA je velmi vhodná také pro rychlou, ekonomickou a spolehlivou genomovazaci běžně se vyskytujících izolátů komplexu *Burkholderia cepacia* a pro druhovou identifikaci izolátů SMG, včetně potenciálu pro přímou detekci z klinického vzorku. Tato detekce může být přínosem zejména u části exacerbací chronických plicních onemocnění, kdy dvoudenní kultivace na semi-selektivním médiu s následnou subkultivací a pak identifikací není uspokojivá z hlediska potřeby časného vedení racionální antimikrobní léčby.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Ahmadian A., Ehn M., Hober S. (2006): Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta* 363: 83-94
- Alfaresi M., Elkosh A. (2006): Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species using real-time PCR with SYBR Green and melting-curve analysis. *Journal of Medical Microbiology* 55: 1711-1715
- Amann R., Glöckner F-O., Neef A. (1997): Modern methods in surface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *Microbiology Reviews* 20: 191-200
- Anbazhagan D., Kanthirvalu G. G., Mansor M., Yan G.O.S., Yusof M.Y., Sekaran S.D. (2010): Multiplex polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of *Enterobacteriaceae* in clinical samples. *African Journal of Microbiology Research* 4: 1186-1191
- Andrysík, T., Machová, I., Petráš, P., Votava, M. (2004): Průkaz hyaluronidázy u kmenů rodu *Staphylococcus*. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 13: 210-212 (Petráš, P. (2004): Doplnění informace k průkazu stafylokokové hyaluronidázy. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 14: 195-196)
- Arbeit R.D. (1995): Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. In: Murray P.R. (Ed): *Manual of Clinical Microbiology*: 190-208, Washington DC.
- Belkum van A. (2003): High-throughput epidemiologic typing in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection* 9: 86-100
- Bergman A., Fernandez V., Holmström K.O., Claesson B.E.B., Enroth H. (2007): Rapid identification of pathogenic yeast isolates by real-time PCR and two-dimensional melting-point analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 26: 813-818
- Carbonnelle E., Mesquita C., Bille E., Day N., Dauphin B., Beretti J-L., Ferroni A., Gutmann L., Nassif X. (2011): MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* 44: 104-109
- Coenye T., Vandamme P., Govan J.R.W., LiPuma J.J. (2001): Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3427-3436
- Correia S., Nascimento C., Pereira L., Cunha M.V., Sá-Correia I., Barreto C. (2008): The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 14: 5-26

- Costa J-M., Garcia-Hermoso D., Olivi M., Cabaret O., Farrugia C., Lecellier G., Dromer F., Bretagne S. (2010): Genotyping of *Candida albicans* using length fragment and high-resolution melting analyses together with minisequencing of a polymorphic microsatellite locus. *Journal of Clinical Methods* 80: 306-309
- Deluca M. (1976): Firefly luciferase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 44: 37-68
- deSilva D., Blackett J. (2007): High-resolution melting & unlabeled probes developing a simple and inexpensive genotyping assay with LunaProbes. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 27, dostupné z: <<http://www.genengnews.com/gen-articles/assay-high-resolution-melting-unlabeled-probes/1986/>>
- Dijkshoorn L., Aucken H., Gerner-Smidt P., Janssen P., Kaufmann M.E., Garaizar J., Ursing J., Pitt T.L. (1996): Comparison of outbreak nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strain by genotypic and phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1519-1525
- Dřevínek P., Hrbáčová H., Cinek O., Bartošová J., Nyč O., Nemeč A., Pohunek P. (2002): Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 3485-3488
- Endimiani A., Luzzaro F., Tamborini A., Lombardi G., Elia V., Belloni R. a Toniolo A. (2002): Identification and antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of nonfermenting gram-negative bacteria by the PhoenixTM automated microbiology system. *Microbiologica* 25: 323-329
- Epsy M. J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.C.D., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill III F.R., Smith T.F. (2006): Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 165-256
- Erali M., Voelkerding K.V., Wittwer C.T. (2008): High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and Molecular Pathology* 85: 50-58
- Fehlberg L.C.C., Adrade L.H.S., Assis D.M., Pereira R.H.V., Gales A.C., Marques E.A. (2013): Performance of MALDI-TOF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* ([tp://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.011](http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.011))
- Grody W.W. (1999): Cystic fibrosis – Molecular diagnosis, population screening and public policy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 123: 1041-1046

- Gossling J. (1988): "Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group".
Reviews of infectious diseases 10: 257-85
- Greatorex J., Ellington M.J., Köser C.U., Rolfe K.J., Curran M.D. (2014): New methods for identifying infectious diseases. British Medical Bulletin 0: 1-9
- Hanulík V., Webber M.A., Chroma M., Uvizl R., Holy O., Whitehead R.N., Baugh S., Matouskova I., Kolar M. (2013): An outbreak of *Burkholderia multivorans* beyond cystic fibrosis. Journal of Hospital Infection 84: 248-251
- Henry D.A., Campbell M.E., LiPuma J.J., Speert D.P. (1997): Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple nex selective medium. Journal of Clinical Microbiology 35: 614-619
- Henry D.A., Mahenthalingam E., Vandamme P., Coenye T., Speert D.P. (2001): Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. Journal of Clinical Microbiology 39: 1073-1078
- Hermann M.G., Durtschi J.D., Bromley K.L., Wittver C.T., Voelkerling K.V. (2006): Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: Cross-platform comparison of instruments and dyes. Clinical Chemistry 52: 494-503
- Holden M.T., Seth-Smith H.M., Crossman L.C., Sebahia M., Bentley S.D., Cerdeño-Tárraga A.M., Thomson N.R., Bason N., Quail M.A., Sharp S., Cherevach I., Churcher C., Goodhead I., Hauser H., Holroyd N., Mungall K., Scott P., Walker D., White B., Rose H., Iversen P., Mil-Homens D., Rocha E.P., Fialho A.M., Baldwin A., Dowson C., Barrell B.G., Govan J.R., Vandamme P., Hart C.A., Mahenthalingam E., Parkhill J. (2009): The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. Journal of Bacteriology 191: 261-277
- Chakravorty S., Aladegbami B., Burday M., Levi M., Marras S.A.E., Shah D., El-Hajj H.H., Kramer F.R., Alland D. (2010): Rapid universal identification of bacterial pathogens from clinical cultures by using a novel sloppy molecular beacon melting temperature signature technique. Journal of Clinical Microbiology 48: 258-267
- Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D. (2007): A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. Journal of Microbiological Methods 69: 330-339
- Chen C-Y. (2014): DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies: both past and present. Frontiers in Microbiology 5, Article 305
- Chen X., Kong F., Wang Q., Li C., Zhang J., Gillbert G. (2011): Rapid detection of isoniazid, rifampin, and ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using high-resolution melting analysis. Journal of Clinical Microbiology 49: 3450-3457

- Cheng J-Ch., Huang Ch-L., Lin Ch-Ch., Chen Ch-Ch., Chang Y-Ch., Chang S-S., Tseng Ch.-P. (2006): Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR. *Clinical Chemistry* 52: 1997-2004
- Ieven M., Loens K., Goossens H. (2004): Detection and characterization of bacterial pathogens by nucleic acid amplification: State-of-the-art review, *Molecular mikrobiology*. In: Persing D. H. a kol. (Eds.): *Diagnostic principles and practice*. 323-341, ASM Press, Washington, D.C.
- Jacobs J.A., Schot C.S., Bunschoten A.E., Schouls L.M. (1996): Rapid species identification of "*Streptococcus milleri*" strains by line blot hybridization: Identification of a distinct 16S rRNA population closely related to *Streptococcus constellatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1717-1721
- Jeng K., Yang S., Won H., Gaydos Ch., Hsieh Y-H., Kecojevic A., Carroll K., Hardick J., Rothman R.E. (2012): Application of a 16S rRNA PCR/HRMA assay for rapid detection of *Salmonella* bacteremia: A case report. *Journal of Clinical Microbiology* 50: 1122-1124
- Jonasson J., Olofsson M., Monstein H-J. (2002): Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. *Acta Pathologica et Microbiologica Immunologica Scandinavica* 110: 263-272
- Keinstinen T., Säynäjäkangas O., Tuuponen T., Kivelä S-L. (1997): Bronchiectasis: an orphan disease with a poorly-understood prognosis. *European Respiratory Journal* 10: 2784-2787
- Keys C.J., Dare D.J., Sutton H., Wells G., Lunt M., McKenna T., McDowall M., Shah H. (2004): Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infection, Genetics and Evolution* 4: 221-242
- Klaschik S., Lehmann L.E., Raadts A., Book M., Gebel J., Hoeft A., Stuber F. (2004): Detection and differentiation of in vitro-spiked bacteria by real-time PCR and melting-curve analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 512-517
- Klenow H., Overgaard-Hansen K., Patkar S.A. (1971): Proteolytic cleavage of native DNA polymerase into two different catalytic fragments. Influence of assay conditions on the change of exonuclease activity and polymerase activity accompanying cleavage. *European Journal of Biochemistry* 22: 371-381
- Komoszynski M., Wojtzak A. (1996): Apyrase (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1310: 233-241

- Krypuy M., Newnham G.M., Thomas D.M., Conron M., Dobrovic A. (2006): High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 6: 295-306
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömborn L., Ståhlberg A., Zoric N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95-125
- Limia A., Jimenez M.L., Alarcon T., Lopez-Brea M. (1999): Five-year analysis of antimicrobial susceptibility of the *Streptococcus milleri* group. *European Journal of Clinical Microbiology* 18: 440-444
- Lin S-Y.G., Rodwell T.C., Victor T.C., Rider E.C., Pham L., Catanzaro A., Desmond E.P. (2013): Pyrosequencing for rapid detection of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical isolates and clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 52: 475-482
- Louie M., Louie L., Simor A. E. (2000): The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious disease. *Canadian Medical Association Journal* 163: 301-309
- Lu J., Yu R., Yan Y., Zhang J., Ren X. (2011): Use of Pyromark Q96 ID pyrosequencing system in identifying bacterial pathogen directly with urine specimens for diagnosis of urinary tract infections. *Journal of Microbiological Methods* 86: 78-81
- Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. (2002): Survey and summary real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30: 1292-1305
- Mahenthiralingam E., Bischof J., Byrne S.K., Radomski C., Davies J.E., AV-Gay Y., Vandamme P. (2000): DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis* and *Burkholderia cepacia* genomovar I and III. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3165-3173
- Mahenthiralingam E., Cambell M.E., Henry D.A., Speert D.P. (1996): Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: Analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2914-2920
- Maiwald M. (2004): Broad-range PCR for detection and identification of bacteria. In: Persing a kol. (Eds.): *Diagnostic principles and practice*. 379-388, ASM Press, Washington, D.C.
- Melamede R.J. (1985): Automatable process for sequencing nucleotide. US Patent 4863849
- Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckevoet U., Ramminger I., Iwen P., Dunn J., Hall G., Wilson D., LaSala P., Kostrzewa M., Harmsen D. (2008): Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA

- gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 1946-1954
- Merchant-Patel S., Blackall P.J., Templeton J., Price E.P., Tong S.Y.C., Huygens F., Giffard P.M. (2010): *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 493-499
- Montgomery J., Wittwer C. T., Kent J. O., Zhou L. (2007): Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clinical Chemistry* 53: 1891-1898
- Motoshima M., Yanagihara K., Morinaga Y., Matsuda J., Hasegawa H., Kohno S., Kamihira S. (2012): Identification of bacteria directly from positive blood culture samples by DNA pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Journal of Medical Microbiology* 61: 1556-1562
- Musil J., Konšťacký S., Kašák V., Salajka F., Jindrák V. (2005): Chronická obstrukční choroba plicní – doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. Společnost všeobecného lékařství, Praha
- Nemcova E., Cernochova M., Ruzicka F., Malisova B., Freiburger T., Nemeč P. (2015): Rapid identification of medically important *Candida* isolates using high resolution melting analysis. *PLoS ONE* 10: e0116940
- Nielsen E.M., Engberg J., Fussing V., Petersen L., Brogren C.H., On S.L.W. (2000): Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry and cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3800-3810
- Nyrén P. (1987): Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Analytical Biochemistry* 167: 235-238
- O'Hara M. (2005): Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli. *Clinical Microbiology Reviews* 18: 147-162
- Olive M. D., Bean P. (1999): Minireview: Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organism. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1661-1669
- Olson A.B., Sibley C.D., Schmidt L., Wilcox M.A., Surette M.G., Corbett C.R. (2010): Development of real-time PCR assays for detection of the *Streptococcus milleri* group from cystic fibrosis clinical specimens by targeting the *cpn60* and 16S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 1150-1160
- Parkins M.D., Sibley C.D., Surette M.G., Rabin H.R. (2008): The *Streptococcus milleri* group an unrecognized cause of disease in cystic fibrosis: a case series and literature review. *Pediatric Pulmonology* 43: 490-497

- Plachý R., Hamal P., Raclavský V. (2005): McRAPD as a new approach to rapid and accurate identification of pathogenic yeasts. *Journal of Microbiological Methods* 60: 107-113
- Quinn J.P. (1998): Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clinical Infectious Diseases* 27: 117-124
- Rashid R.M., Salah W., Parada J.P. (2007): "'*Streptococcus milleri*' aortic valve endocarditis and hepatic abscess". *Journal of Medical Microbiology* 56: 280-282
- Reik R., Spilker T., LiPuma J.J. (2005): Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from person with or without cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 2926-2928
- Reischl U. (2006): Melting of the ribosomal RNA gene reveals bacterial species identity: A step toward a new rapid test in clinical microbiology. *Clinical Chemistry* 52: 1985-1987
- Ruoff K.L. (1988): *Streptococcus anginosus* ("*Streptococcus milleri*"): the unrecognized pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 1: 102-108
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 74: 5463-5467
- Sauer S., Kliem M. (2005): Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews* 8: 74-82
- Segel I.H., Renosto F., Seubert P.A. (1987): Sulfate-activating enzymes. *Methods in Enzymology* 143: 334-349
- Sibley Ch.D., Grinwis M.E., Field T.R., Parkins M.D., Norgaard J.C., Gregson D.B., Rabin H.R., Surette M.G. (2010): McKay agar enables routine quantification of the '*Streptococcus milleri*' group in cystic fibrosis patients. *Journal of Medical Microbiology* 59: 534-540
- Sinthuwat T., Poowasanpetch P., Wongngamrunroj A., Promso S., Auewarakul Ch., Mooney S., Tocharoentanaphol Ch. (2008): High-resolution melting curve analysis for genotyping of common SNP in *MTHFR* gene using fixed-cell suspension. *Molecular and Cellular Probe* 22: 329-332
- Skalka B. (1985): Hyaluronidase test in the diagnosis of staphylococci. *Veterinarni Medicina* 30: 373-378
- Skow Á., Mangold K. A., Tajuddin M., Huntington A., Fritz B., Thomson R. B. jr., Kaul K. L. (2005): Species-level identification of staphylococcal isolates by real-time PCR and melt curve analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 2876-2880

- Song Y.G., Shim S.G., Kim K.M., Lee D-H., Kim D-S., Choi S-H., Song J-Y., Kang H-L., Baik S-C., Lee W-K., Cho M-J. a Rhee K-H. (2014): Profiling of the bacteria responsible for pyogenic liver abscess by 16S rRNA gene pyrosequencing. *Journal of Microbiology* 52: 504-509
- Stanier R.Y., Palleroni N.J., Doudoroff M. (1966): The aerobic *Pseudomonads*: a Taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43: 159-271
- Sussman M. (2001): Molecular medical microbiology: The concept. In: Sussman M. (Ed.): *Molecular medical microbiology I*. 1-4, Academic Press, Londýn
- Tang Y-W., Ellis N.M., Hopkins M.K., Smith D.H., Dodge D. E., Persing D.H. (1998): Comparision of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 3674-3679
- Tewari D., Cieply S., Livengood J. (2011): Identification of bacteria recovered from animals using the 16S ribosomal RNA gene with pyrosequencing and Sanger sequencing. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23: 1104-1108
- Tong S.Y.C., Giffard P.M. (2012): Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 50: 3418-3421
- Trtková J., Pavlíček P., Rusková L., Hamal P., Koukalová D., Raclavský V. (2009): Performance of optimized McRAPD in identification of 9 yeast species frequently isolated from patient samples: potential for automation. *BMC Microbiology* 9: 234-255
- Trtková J., Raclavský V. (2006): Molecular-genetic approaches tro identification and typing of pathogenetic *Candida* yeast. *Biomedical Papers* 150: 51-61
- Vaidyanathan S., Winder C.L., Wade S.C., Kell D.B., Goodacre R. (2002): Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spektrometry of whole bacterial cell sand the detection of high mass (>20kDa) proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16: 1276-1286
- Valentine N., Wuschel S., Wuschel D., Petersen C., Wahl K. (2005): Effect of Culture Conditions on Microorganism Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Applied and enviromental Microbiology* 71: 58-64
- Vandamme P., Holmes B., Coenye T., Goris J., Mahenthiralingam E., LiPuma J.J., Govan J.R.W. (2003): *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. - A new twist to an old story. *Research in Microbiology* 154: 91-96
- Verall R. (1986): The *Streptococcus milleri* group. *Infection Control* 7: 558-560
- Vossen R. H. A. M., Aten E., Roos A., Dunnen den J. T. (2009): High-resolution melting analysis (HRMA) – more than just sequence variant screening. *Human Mutation* 30: 1-7

- Waite R.D., Wareham D.W., Gardiner S., Whiley R.A. (2011): A simple, semiselective medium for anaerobic isolation of anginosus group streptococci from patients with chronic lung disease. *Journal of Clinical Microbiology* 50: 1430-1432
- Whiley R.A., Beighton D. (1991): Emended description and recognition of *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius* and *Streptococcus anginosus* as distinct species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 1-5
- Whitby P. W., Carter K. B., Hatter K. L., LiPuma J. J., Stull T. L. (2000): Identification of members of the *Burkholderia cepacia* complex by species-specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2962-2965
- Wittwer C.T. (2009): High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human Mutation* 30 (6): 857-859
- Wong Y.P., Chua K.H., Thong K.L. (2014): One-step species-specific high resolution melting analysis for nosocomial bacteria detection. *Journal of Microbiological Methods* 107: 133-137
- Wong I., Patel S.S., Johnson K.A. (1991): An induced-fit kinetic mechanism for DNA replication fidelity: direct measurement by single-turnover kinetics. *Biochemistry* 30: 526-537
- Yamaura M., Sato T., Echigo S., Takahashi N. (2005): Quantification and detection of bacteria from postoperative maxillary cyst by polymerase chain reaction. *Oral Microbiology and Immunology* 20: 333-338
- Yang S., Ramachandran P., Rothman R., Hsieh Y.-H., Hardick A., Won H., Kecojevic A., Jackman J., Gaydos Ch. (2009): Rapid identification of biothreat and other clinically relevant bacterial species by use of universal PCR coupled with high-resolution melting analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 2252-2255
- Yang D.H., Zhang Y.Y., Du P.C., Xu L., Wang H.Y., Han N., Chen C., Gao Z.C. (2014): Rapid identification of bacterial species associated with bronchiectasis via metagenomic approach. *Biomedical and Environmental Science* 27: 898-901
- Zaidi N., Konstantinou K., Zervos M. (2003): The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Molecular Methods in Human Infections* 127: 1098-1105
- Zahariadis G., Levy M.H., Burns J.L. (2003): Cepacia-like syndrome caused by *Burkholderia multivorans*. *Canadian Journal of Infectious Diseases* 14: 123-125

Další zdroje:

<http://bccm.belspo.be/index.php>

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

<http://www.lmg.cz/index.php?kategorie=2&lang=cze&text=10>

8. PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

8.1 Původní publikace v časopisech s impakt faktorem

Raclavský V., Novotný R., Stary L., Navrátilová L., Zatloukal J., Jakubec P., Zapalka M., Kopriva F., Kolek V. (2016): NAS agar is more suitable than McKay agar for primary culture of *Streptococcus milleri* group (SMG) fastidious bacteria, *S. intermedius* in particular. *Folia Microbiologica*, manuscript under review (IF 1,0)

Raclavský V., Stromerová N., Safarová D., Bardoň J., Zatloukal J., Zapalka M., Jakubec P., Navrátilová L., Novotný R. (2016): McRAPD unlike MALDI TOF MS is suitable candidate for routine discrimination of new *Haemophilus influenzae* strains acquisition in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and cystic fibrosis. *Biomedical papers*, manuscript under review (IF 1,2)

Navrátilová L., Procházková P., Bardoň J., Novotný R., Zapalka M., Jakubec P., Zatloukal J., Kolek V., Kopriva F., Flodrová P., Raclavský V. (2016): Performance of pyrosequencing versus MALDI TOF MS in bacteria identification in chronic lung disease. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, manuscript under review (IF 0,778)

Navrátilová L., Bardoň J., Novotný R., Zatloukal J., Jakubec P., Kolek V., Zapalka M., Kopriva F., Procházková P., Raclavský V. (2016): The *Streptococcus milleri* group in chronic obstructive pulmonary disease. *Biomedical papers*, in press (IF 1,2)

Navrátilová L., Šafařová D., Raclavský V. (2014): Usefulness of PCR-HRMA in identification of non-fermentative Gram-negative rods recovered from patients suffering cystic fibrosis or chronic obstructive pulmonary disease. *Folia Microbiologica* 59: 17-21 (IF 1,0)

Navrátilová L., Chromá M., Hanulík V., Raclavský V. (2013): Possibilities in identification of genomic species of *Burkholderia cepacia* complex by PCR and RFLP. *Polish Journal of Microbiology* 62 (4): 373-376 (IF 0,697)

8.2 Původní publikace v recenzovaných časopisech

Raclavský V., Bardoň J., Petrželová J., Procházková P., Novotný R., Navrátilová L., Zapalka M., Jakubec P., Zatloukal J., Kopriva F., Kolek V. (2016): Zvýšený záchyt bakteriálních patogenů z dýchacích cest nemocných cystickou fibrózou při prodloužené kultivaci ve vlhké komůrce. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, rukopis v recenzním řízení

8.3 Přehledové publikace v časopisech s impakt faktorem

Pulzova L., Navratilova L., Comor L. (2016): Alteration in outer membrane permeability: The universal drug resistance strategy in *Klebsiella*. Microbial Drug Resistance, manuscript under review (IF 2,49)

8.4 Kapitoly v monografiích, učebních textech

Navrátilová L. (2015): Kvasinky. 44-74. In: Navrátil M., Navrátilová L., Válová P. (Ed.): Kapitoly z molekulární biologie a genetiky mikroorganismů. Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci (ISBN 978-80-244-4651-6)

8.5 Abstrakty k přednáškám a posterům (pouze 1. autor)

Navrátilová L., Procházková P., Bardoň J., Raclavský V. (2015): Comparison of two evolving methods in identification of bacteria - MALDI and pyrosequencing. In: Book of Abstracts Hot topics in microbiology 2015: 49

Navrátilová L., Nováková E., Raclavský V. (2014): Využití metody PCR s následnou analýzou tání při genomovariaci a typizaci bakterií. In: Sborník abstrakt XXII. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny: 17

Navrátilová L., Bardoň J., Novotný R., Zatloukal J., Jakubec P., Kolek V., Zápalka M., Kopřiva F., Procházková P., Raclavský V. (2014): *Streptococcus milleri* group (SMG) in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. In: Abstrakta II. Kongres české pneumologické a ftizeologické společnosti ČLS JEP: 105

Navrátilová L., Nováková E., Raclavský V. (2014): Identifikace a typizace vybraných bakteriálních druhů pomocí PCR-MCA. In: (Eds) Modrianský M. (2014): Konference vědeckých prací studentů DSP: 19

Navrátilová L., Bardoň J., Procházková P., Zápalka M., Kopřiva F., Zatloukal J., Jakubec P., Kolek V., Novotný R., Raclavský V. (2013): Charakterizace streptokoků skupiny milleri u pacientů trpících cystickou fibrózou a chronickou obstrukční plicní nemocí. In: Sborník abstrakt, Kongres klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie: 153

Navrátilová L., Bardoň J., Procházková P., Jakubec P., Zatloukal J., Kolek V., Raclavský V. (2013): Streptokoky skupiny milleri u pacientů trpících cystickou fibrózou (CF) a chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN). In: Sborník abstrakt, 26. Kongres Československé společnosti mikrobiologické: 158

9. SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ, PŘÍLOH A POUŽITÝCH ZKRATEK

9.1 Seznam tabulek

Tabulka I:	Přehled vybraných fenotypových metod
Tabulka II:	Přehled vybraných genotypových metod
Tabulka III:	Srovnání spolehlivosti identifikace rodu/druhu 70 bakteriálních kultur pomocí PCR-HRMA a PCR-ESI-MS
Tabulka IV:	Seznam genomovarů komplexu <i>Burkholderia cepacia</i>
Tabulka V:	Referenční kmeny pro validaci PCR-HRMA pro rozlišení genomovarů komplexu <i>Burkholderia cepacia</i>
Tabulka VI:	Hraniční hodnoty inhibičních zón v okolí disků s antibiotiky, používané pro rod <i>Streptococcus</i>
Tabulka VII:	Seznam primerů použitých při PCR
Tabulka VIII:	Složení reakční směsi pro jednu PCR reakci
Tabulka IX:	Seznam genomovar-specifických primerů použitých při specifické PCR
Tabulka X:	Složení reakční směsi pro jednu PCR reakci
Tabulka XI:	Seznam primerů použitých při real-time PCR
Tabulka XII:	Seznam primerů použitých při nested PCR
Tabulka XIII:	Seznam primerů použitých pro amplifikaci před pyrosekvencováním
Tabulka XIV:	Složení reakční směsi pro jednu PCR reakci
Tabulka XV:	Zastoupení klinických izolátů
Tabulka XVI:	Souhrn získaných výsledků identifikace bakterií pomocí MALDI-TOF MS, pyrosekvencování a PCR-HRMA
Tabulka XVII:	Vyhodnocení citlivosti, specifity a výkonu použitých metod
Tabulka XVIII:	Velikost PCR produktů při genomovar-specifické PCR
Tabulka XIX:	Fenotypové charakteristiky izolátů SMG
Tabulka XX:	Srovnání výsledků identifikace bakterií pyrosekvencováním v prezentované studii a pyrosekvencováním a Sangerovým sekvencováním (500 bp) ve studii Tewari a kol., 2011

9.2 Seznam obrázků

- Obrázek 1: Křivky tání: A) normalizované křivky tání, B) derivované křivky tání, vypočtené jako záporná derivace fluorescence na teplotě v každém měřeném bodě (-dF/dT)
- Obrázek 2: Schématické znázornění principu pyrosekvencování
- Obrázek 3: Schéma zastoupení významných druhů ve studii
- Obrázek 4: Algoritmus rozlišení gramnegativních nefermentujících tyčinek
- Obrázek 5: Reprezentativní křivky významných gramnegativních nefermentujících tyčinek
- Obrázek 6: Izolát číslo 234 (*B. cenocepacia*) na krevním agaru
- Obrázek 7: Izolát číslo 234 (*B. cenocepacia*) na selektivní půdě (BCA, *Burkholderia cepacia* agar)
- Obrázek 8: Rozlišení genomovarů *Burkholderia cepacia* komplexu pomocí PCR-HRMA, genomovar I je zastoupen izolátem 245, genomovar II izolátem 1388, genomovar III podtyp A izolátem 234, genomovar III podtyp B referenčním kmenem LMG 16656, genomovar IV referenčním kmenem LMG 14294 a genomovar V referenčním kmenem LMG 10929
- Obrázek 9: Pyrogram amplifikovaného fragmentu 16S rDNA *Burkholderia multivorans*, izolát číslo 1388
- Obrázek 10: Pyrogram amplifikovaného fragmentu 16S rDNA *Burkholderia cenocepacia*, izolát číslo 234
- Obrázek 11: Spektrum významných proteinů u *Burkholderia multivorans*, izolát číslo 1388
- Obrázek 12: Spektrum významných proteinů u *Burkholderia cenocepacia*, izolát číslo 234
- Obrázek 13: Izolát číslo 313 (*S. anginosus*) na krevním agaru
- Obrázek 14: Izolát číslo 313 (*S. anginosus*) na McKay agaru
- Obrázek 15: Reprezentativní křivky zástupců SMG při aplikaci real-time PCR-HRMA; ~*S. anginosus*, ~*S. constellatus* a ~*S. intermedius*
- Obrázek 16: Graf hodnot teplot tání SMG u real-time PCR-HRMA
- Obrázek 17: Reprezentativní křivky zástupců SMG při aplikaci nested PCR-HRMA; ~*S. anginosus*, ~*S. constellatus* a ~*S. intermedius*
- Obrázek 18: Graf hodnot teplot tání SMG u nested PCR
- Obrázek 19: Reprezentativní amplifikační křivky SMG pro real-time PCR a nested PCR
- Obrázek 20: Derivované křivky tání HRM amplikonů
- Obrázek 21: Výsledek identifikace bakterií na základě prvních 10 bází

9.3 Seznam použitých zkratk

BE	bronchiektázie
CF	cystická fibróza
f	<i>forward</i> primer
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i> , typ hybridizační sondy
HRMA	analýza tání s vysokým rozlišením, <i>High resolution melting analysis</i>
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc (angl. COPD, <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
r	<i>reverse</i> primer
Rep	repetitivní extragenová palindromická sekvence, <i>Repetitive extragenic palindromic sequence</i>
T _m	teplota tání, <i>melting temperature</i>
V1-9	variabilní oblasti 1-9 genu pro 16S rDNA

9.4 Seznam příloh

- Příloha I: Použité chemikálie, roztoky, reagentie a přístrojové vybavení
- Příloha II: Biochemické testy – vyhodnocení RapID NF plus pro komplex *Burkholderia cepacia*
- Příloha III: Biochemické testy – vyhodnocení RapID STR pro skupinu *Streptococcus milleri*
- Příloha IV: Seznam druhů a výsledky identifikace MALDI-TOF MS, pyrosekvencování a PCR-HRMA

10. PŘÍLOHY

Příloha I

Použité chemikálie, roztoky, reagensie a přístrojové vybavení

Kultivace bakteriálních izolátů:

Columbia krevní agar s ovčí krví PLUS (5%) (*Columbia agar with sheep blood – 5 %*, PB5039A, Oxoid)

Burkholderia cepacia agar (PO0938, Oxoid)

McKay agar (Sibley a kol., 2010; připraveno na zakázku, Oxoid)

Čokoládový agar s Vitoxem (*Chocolate agar with Vitox*, PO5090A, Oxoid)

Čokoládový agar s bacitracinem a Vitoxem (*Haemophilus selective agar – Chocolate agar with Vitox and bacitracin*, PO5097A, Oxoid)

MH bujón (Mueller-Hinton bujón, CM0405, Oxoid)

Komerčně dodávané kity a soupravy:

DNA isolation kit (IDNA250, GeneProof)

Haemophilus influenzae antiséra (200471, Denka Seiken)

kryobanka B (PP64, ITEST plus s.r.o.)

LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (04909631001, Roche)

OPN test (2005, Diagnostics)

OXItest (10003324, PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.)

PathoDxtra Strep grouping kit (DR0710M, Thermo Scientific)

RapID NF Plus panel (R8311001, Remel)

Rapid STR system (R4653052, Remel)

Chemikálie a reagensie:

96% etanol (24106, Sigma-Aldrich)

Acetonitril (34967-250ML, Sigma-Aldrich)

Agaróza (11404.07, Serva)

Benzylpenicilin E-test strip 0,002-32 µl/mL (412265, bioMérieux)

Cefepim disk (30 µg) (66098, Bio-Rad)

Deionizovaná voda (dH₂O)

Deoxynukleotidtrifosfáty (dGTP, dATP, dCTP, dTTP; 100 mmol/l) (U1330, Promega)

DNA loading dye (R0611, Thermo Scientific)

Erytromycin disk (15 µg) (66448, Bio-Rad)

GoodView Nucleic Acid Stain (Ecoli)

GeneRuler 50 bp DNA ladder (SM0373, Thermo Scientific)

HCCA (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) (C8982-10X10MG, Sigma-Aldrich)

Klindamycin disk (2 µg) (66328, Bio-Rad)

Kotrimoxazol disk (sulfametoxazol/trimetoprim 1.25/23.75 µg) (68898, Bio-Rad)

Kyselina mravenčí (F0507-100ML, Sigma-Aldrich)
LCGreen^{TM Plus+} (BCHM-ASY-0005, BioChem)
PCR olej (P043, Top-Bio)
PCR pufr – kompletní (10x) (T058, Top-Bio)
PCR voda (PCR-H₂O) (P042, Top-Bio)
Penicilin (6 µg-10 IU) (67218, Bio-Rad)
PyroMark PCR kit (978705, Qiagen)
PyroMark Gold Q96 reagents (972804, Qiagen)
PyroMark Q96 cartridge (979004, Qiagen)
PyroMark Q96 plate low (979002, Qiagen)
PyroMark annealing buffer (979009, Qiagen)
PyroMark binding buffer (979006, Qiagen)
PyroMark denaturation solution (979007, Qiagen)
PyroMark washing buffer (979008, Qiagen)
Streptavidin sepharose High performance (17-5113-01, GE Healthcare Life Sciences)
Taq polymeráza (T037, Top-Bio)
TBE 10x koncentrovaný (93290-1L, Sigma-Aldrich)
Tetracyklin (30 µg) (67448, Bio-Rad)
Trifluoroctová kyselina (T6508-25ML, Sigma-Aldrich)

Použité laboratorní vybavení a software:

Automatické mikropipety FinnpiPETTE + plastové sterilní špičky (10-1000 µl) (LabSystem)
Bakteriální klíčky plastové o objemu 1 µl a 10 µl (Helago)
Bio-Rad CFX 96 termocykler (Bio-Rad)
Biohazard Clean Air flow-box (Schoeller Instruments)
Centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet)
Elektroforetická komora s příslušenstvím (Fisherbrand)
Hlubokomrazicí box s příslušenstvím (Sanyo)
Laboratorní inkubátor (termostat) INCUCCELL (BMT)
Destička pro vzorky MALDI-TOF MS (Bruker)
MALDI-TOF-MS Microflex analyzátor (Bruker)
Mikrozkumavky typu Eppendorf (0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml a 1,5 ml) (Eppendorf)
Mini-centrifuga (Labnet International)
Podložní sklíčka (DispoLab)
Pyromark Q96 ID sekvenátor (Qiagen)
PyroMark Q96 vacuum Workstation (Qiagen)
RotorGene Q termocykler (Qiagen)
Rukavice (P-Lab)
Tepelný blok Thermo Shaker TS-100 (BioSan)
UV transiluminátor G:BOX (Syngene)
Vortex-Genie2 (Scientific Industries)
Zdroj stejnosměrného napětí Powerpack P25 (Biometra)

Bio-Rad CFX Manager V1.6.541.1028 (Bio-Rad)

ERIC (**E**lectronic **R**ap**I**D**C**ompendium) software for RapID systems (Thermo Scientific)

MALDI Biotyper 3.0 (Bruker)

Rotor-Gene Q Series Software (Quiagen)

On-line databáze:

GenBank, prohlédávání BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (nucleotide blast,
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Příloha II

Biochemické testy – vyhodnocení RapID NF plus pro komplex *Burkholderia cepacia*

Test		Výsledek		Počet izolátů s uvedeným výsledkem
ADH	hydrolýza argininu	-	žlutá	28
TRD	utilizace alifatických thiolů	-	oranžová	28
EST	hydrolýza triglyceridů	+	žlutá	28
PHS	enzymatická hydrolýza určitého bezbarvého aryl-substituovaného glykosidu/fosfoesteru	+	žlutá	26
NAG		-	bílá	22
αGLU		-	bílá	28
βGLU		-	bílá	28
ONPG		-	bílá	28
URE	utilizace močoviny	-	žlutá	28
GLU	fermentace glukózy	-	zelená-modrá	28
Po přidání reagentu:				
PRO	enzymatická hydrolýza daného arylamidu	+	růžová-fialová	28
PYR		-	bílá	28
GGT		+	růžová-fialová	28
TRY		-	bílá	28
BANA		-	bílá	28
IND		utilizace tryptofanu	-	oranžová
NO ₃	redukce dusičnanů na dusitany	+/-	žlutá/červená	26/2

Poznámka: - negativní výsledek testu
+ pozitivní výsledek testu

Příloha III

Biochemické testy – vyhodnocení RapID STR pro skupinu *Streptococcus milleri*

Test		Výsledek		Počet izolátů s uvedeným výsledkem
ARG	hydrolýza argininu	+	červená	40
ESC	hydrolýza glukosidu za tvorby esculetinu, který reaguje s železitými ionty	+	černá	40
MNL	utilizace daného karbohydrátu	-	červená	0
SBL		-	červená	0
RAF		-	červená	0
INU		-	červená	0
GAL	enzymatická hydrolýza určitého bezbarvého p-nitrofenyl substituovaného glykosidu/fosfoesteru	+/-	žlutá/bez barevné změny	32/8
GLU		+/-	žlutá/bez barevné změny	8/32
NAG		+/-	žlutá/bez barevné změny	4/36
PO ₄		+	žlutá	40
Po přidání reagentu:				
TYR	hydrolýza arylamidu	+	fialová	40
HPR		-	bez barevné změny	0
LYS		+	fialová	40
PYR		-	bez barevné změny	0

Poznámka: - negativní výsledek testu
+ pozitivní výsledek testu

Příloha IV

Seznam druhů a výsledky identifikace MALDI-TOF MS, pyrosequencování a PCR-HRMA

Druh	Počet izolátů	Nejvyšší dosažená úroveň identifikace		
		MALDI-TOF MS	pyrosequencování	PCR-HRMA
<i>Acinetobacter baumannii, calcoaceticus, pittii</i>	5	druh	rod	čeleď
<i>Acinetobacter ursingii</i>	1	druh	rod	chybná
<i>Actinomyces oris</i>	5	druh	druh	rod
<i>Aggregatibacter aphrophilus, segnis</i>	12	druh	skupina 1*	čeleď
<i>Achromobacter ruhlantii, spanius, xylosoxidans</i>	12	druh	rod	rod
<i>Asaia bogorensis</i>	1	žádná	druh	žádná
<i>Bacillus licheniformis</i>	2	druh	žádná	rod
<i>Bacillus pumilus</i>	3	druh	druh	rod
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	3	druh	rod	druh
<i>Brevibacterium casei</i>	2	druh	žádná	žádná
<i>Burkholderia cepacia</i> komplex (<i>B. cenocepacia, cepacia sensu stricto, multivorans</i>)	28	druh	komplex	čeleď
<i>Citrobacter freundii</i>	2	druh	druh	skupina 3***
<i>Corynebacterium amycolatum, durum, propinquum, pseudodiphtheriticum, striatum</i>	18	druh	rod	rod
<i>Corynebacterium aurimucosum, matruchotii</i>	2	druh	rod	žádná
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	4	druh	druh	čeleď
<i>Delftia acidovorans</i>	2	druh	druh	žádná
<i>Eikenella corrodens</i>	1	druh	druh	čeleď
<i>Enterobacter asburiae, aerogenes, cloacae, kobei, ludwigii</i>	11	druh	skupina 2**	skupina 3***
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	druh	druh	chybná
<i>Erwinia persicina</i>	1	druh	rod	žádná
<i>Escherichia coli</i>	4	druh	druh	skupina 3***
<i>Gemella haemolysans, sanguinis</i>	16	druh	žádná	rod
<i>Granulicatella adiacens</i>	13	druh (7)/ žádná (6)	druh	druh

Seznam druhů a výsledky identifikace MALDI-TOF MS, pyrosekvencováí a PCR-HRMA - pokračování

Druh	Počet izolátů	Nejvyšší dosažená úroveň identifikace		
		MALDI-TOF MS	pyrosekvencováí	PCR-HRMA
<i>Haemophilus haemolyticus, influenzae</i>	83	druh	skupina 1*	čeleď (80)/chybná (3)
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	1	druh	žádná	čeleď
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	127	druh	druh	čeleď (123)/chybná (4)
<i>Haemophilus pittmaniae</i>	1	druh	rod	čeleď
<i>Chryseobacterium hominis</i>	1	druh	žádná	žádná
<i>Kingella denitrificans</i>	5	druh	druh	čeleď
<i>Klebsiella oxytoca, pneumoniae</i>	16	druh (15)/ žádná (1)	skupina 1*	skupina 3***
<i>Lactobacillus casei, paracasei</i>	8	druh	rod	rod
<i>Lactobacillus fermentum, plantarum, rhamnosus, salivarius</i>	16	druh	druh	rod
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1	druh	rod	rod
<i>Lactobacillus kimchii</i>	1	druh	žádná	rod
<i>Lactococcus lactis</i>	1	druh	žádná	žádná
<i>Micrococcus luteus</i>	1	druh	druh	žádná
<i>Moraxella catarrhalis, liquefaciens, nonliquefaciens</i>	15	druh	rod	čeleď
<i>Neisseria flavescens, macacae</i>	4	druh	rod	čeleď
<i>Neisseria oralis</i>	1	žádná	druh	čeleď
<i>Ochrobactrum tritici</i>	2	druh	žádná	žádná
<i>Pannonibacter phragmitetus</i>	2	druh	druh	žádná
<i>Proteus mirabilis, vulgaris</i>	7	druh	skupina 1*	skupina 3***
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	127	druh (126)/ žádná (1)	druh	druh
<i>Pseudomonas grimontii</i>	9	druh	rod	druh
<i>Pseudomonas mendocina, veronii</i>	7	druh	rod	rod
<i>Ralstonia pickettii</i>	3	druh	druh	druh
<i>Rhizobium radiobacter</i>	1	druh	čeleď	žádná
<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i>	1	druh	rod	žádná

Seznam druhů a výsledky identifikace MALDI-TOF MS, pyrosekvencování a PCR-HRMA - pokračování

Druh	Počet izolátů	Nejvyšší dosažená úroveň identifikace		
		MALDI-TOF MS	pyrosekvencování	PCR-HRMA
<i>Rothia aeria</i>	8	druh	rod	rod
<i>Rothia dentocariosa, mucilaginoso</i>	26	druh	druh	rod (25)/žádná (1)
<i>Serratia marcescens</i>	3	druh	druh	skupina 3***
<i>Staphylococcus aureus, cohnii, epidermidis, hominis</i>	70	druh	druh	rod
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1	žádná	druh	rod
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	19	druh	druh	skupina 3***
<i>Streptococcus agalactiae, massiliensis, parasanguinis</i>	48	druh	druh	rod
<i>Streptococcus anginosus, constellatus, dysgalactiae, gordonii, intermedius, mitis, oralis, peroris, pneumoniae, pyogenes, salivarius, sanguinis, vestibularis</i>	351	druh (339)/ žádná (12)	rod (350)/ žádná (1)	rod
<i>Streptococcus infantis, oligofermentans</i>	3	žádná	druh	rod
<i>Streptococcus mutans</i>	5	druh	žádná	rod
<i>Streptomyces scabiei, griseus</i>	2	druh	rod	chybná
<i>Variovorax</i> sp.	2	žádná	rod	žádná
Nebylo identifikováno	8	-	-	-

*Skupina 1 zahrnuje rody *Aggregatibacter*, *Haemophilus* (*haemolyticus* a *influenzae*) a *Proteus*.

**Skupina 2 zahrnuje rody *Enterobacter* a *Klebsiella*.

***Skupina 3 zahrnuje zástupce čeledi *Enterobacteriaceae* a druh *Stenotrophomonas maltophilia*.