



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra genetiky a biotechnologií

Diplomová práce

Molekulární detekce *Mycoplasma gallisepticum* na základě
celogenomových dat

Autor práce: Bc. Jakub Kuráž
Vedoucí práce: Ing. Pavel Beran, Ph.D.
Konzultant práce: Ing. Kristina Beranová

České Budějovice
2024

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Tato práce shrnuje základní poznatky o druhu *Mycoplasma gallisepticum* a navrhuje detekčně-rozlišovací metodu, která odlišuje tento druh od ostatních druhů rodu *Mycoplasma*. Optimalizací metody real time PCR bylo umožněno zpřesnění a zvýšení efektivity detekce unikátních sekvencí z genomu *M. gallisepticum*. Funkčnost a správnost metody byla posléze ověřena detekcí *M. gallisepticum* ve směsných vzorcích ptačích a myších mykoplazem.

Klíčová slova: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mollicutes*, onemocnění drůbeže, bakterie, faktory virulence, detekce, vakcína, real time PCR, multiplex PCR, MAMA, *mg2*, *glpK*, *potC*, *plpA*, *pvpA*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma anatis*, *Mycoplasma pulmonis*

Abstract

This thesis reviews the basic knowledge of a bacteria *Mycoplasma gallisepticum* and attempts to propose a functional detection protocol to distinguish *M. gallisepticum* from related species of the genus *Mycoplasma*. Real time PCR optimization has refined the specificity and increased the efficiency of detection of selected genomic loci for *M. gallisepticum*. The functionality and accuracy of the method was verified in laboratory experiments by detecting the occurrence of *M. gallisepticum* in mixed *Mycoplasma* samples.

Keywords: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mollicutes*, poultry disease, bacteria, virulence factors, detection, vaccine, real time PCR, multiplex PCR, MAMA, *mg2*, *glpK*, *potC*, *plpA*, *pvpA*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma anatis*, *Mycoplasma pulmonis*

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucímu diplomové práce Ing. Pavlu Beranovi, PhD. za vedení, ochotu, trpělivost, čas a rady při vypracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Kristině Beranové, za ochotu při poskytnutí rad a konzultací ohledně laboratorní části mé práce, zapůjčení testovacího materiálu a uvedení do chodu laboratoře, Ing. Dagmar Stehlíkové, PhD. za poskytnutí dalších laboratorních vzorků, RNDr. Mgr. Daniele Hlávkové, za gramatickou korekturu mé práce a v neposlední řadě i rodině a přátelům za psychickou podporu v době studia.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Literární přehled.....	8
2.1	<i>Mycoplasma</i> sp.....	8
2.1.1	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	8
2.1.2	Příbuzné druhy	15
2.2	Molekulární detekce	17
2.2.1	Metody molekulární detekce.....	17
2.2.2	Celogenomová data.....	21
3	Cíle práce	26
4	Materiál a metody	27
4.1	Identifikace unikátních sekvencí a návrh primerů	27
4.2	Odběr vzorků.....	28
4.3	Izolace DNA.....	28
4.4	Optimalizace reakčních podmínek pro real time PCR	31
5	Výsledky	33
5.1	Úvodní test primerové specificity	33
5.2	Gradientová PCR.....	39
5.3	Testování druhové specificity vybraných primerů	40
6	Diskuse.....	44
7	Závěr	47
	Seznam použité literatury.....	48
	Seznam internetových zdrojů.....	60
	Seznam obrázků a grafů	61
	Seznam tabulek	62
	Seznam použitých zkratk.....	63

1 Úvod

Fylogeneze, vycházející z morfologických znaků, nepředstavuje v současné době spolehlivý selektivní pohled na rozdílnost jednotlivých druhů bakterií. Z tohoto důvodu se identifikace druhů řídí získanými sekvenančními daty genetické informace. Odlišnost na úrovni genetické informace je poměrně stabilním prostředkem pro získání spolehlivějších dat a poskytuje přesnější rozhraní nejen mezi jednotlivými druhy, ale dokáže odlišit i variabilitu v rámci druhu.

Rod *Mycoplasma* zahrnuje široké spektrum patogenních bakterií, způsobujících respirační onemocnění u obratlovců. Svým parazitickým působením snižují životaschopnost jedinců a u nakažených vysokoprodukčních zvířat (skot, prasata, drůbež) způsobují pokles užitkovosti. Navzdory relativně malému genomu (cca 500–1500 kbp), absenci buněčné stěny a aerotoleranci jsou mimořádně odolnou skupinou bakterií. V současné době jejich infiltraci do hostitele ztěžují vakcíny, které pomáhají očkováním hospodářským zvířatům se s nákazou vypořádat s mnohem menšími následky. Nicméně molekulární profil bakteriálních kmenů způsobujících nákazu a kmenů použitých k přípravě vakcín je velmi podobný, což znemožňuje detekci patogenních kmenů. Právě proto je potřebné hledat specifické metody, které umožní rozlišit jejich původ, zamezí šíření mykoplazem a umožní účinnou léčbu. Současné detekční metody jsou založeny především na metodách nepřímých, které jsou sice finančně výhodné, ale časově náročné především kvůli dlouhým kultivačním časům. Proti nim vystupují přímé metody, jako jsou real time PCR nebo konvenční PCR, které nevyžadují dlouhé kultivační intervaly a umožňují tak časově nenáročnou detekci. Nevýhodou ovšem je relativní finanční nákladnost metod a potřeba detekčních přístrojů. Pro detekci DNA ptačích druhů mykoplazem jsou striktně využívány PCR metody se specifickými sondami, které dokážou odhalit a rozlišit druhy *Mycoplasma gallisepticum* (Edward a Kanarek, 1960), *Mycoplasma synoviae* (Olson a kol., 1964) a *Mycoplasma meleagridis* (Yamamoto a kol., 1965), a to samostatně i ve směsných vzorcích.

Z důvodu snazší detekce a možného příspěvku dalších detekčních mechanismů byly v praktické části této práce získány unikátní DNA sekvence druhu *Mycoplasma gallisepticum* z genomových dat a na základě softwarové analýzy navrženy detekční primery na tyto unikátní sekvence. K prokazatelné detekci byla laboratorně optimalizována metodika PCR detekce s navrženými primery a zjištěna primerová specifita k příbuzným mykoplazmárním druhům.

2 Literární přehled

2.1 *Mycoplasma* sp.

Rod *Mycoplasma* je jednou z nejjednodušších patogenních skupin bakterií, čítající dnes již přes 200 druhů, osidlujících širokou škálu habitatů s velkou hostitelskou i tkáňovou specifitou. Mykoplazmy osidlují především mukózní povrchy urogenitálního, respiračního a zažívacího traktu, očí, mléčných žláz nebo kloubů (Mungunthan, 2023). Razin a kol. (1998) zmiňují, že nezávisle na specifitě výskytu mohou různé druhy mykoplazem osidlovat i netradiční prostředí. Příkladem může být druh *Mycoplasma pneumoniae* (Somerson a kol., 1963) obvykle osidlující sliznici respiračního traktu, se schopností osídlit urogenitálním trakt, nebo *Mycoplasma genitalium* (Tully a kol., 1983) s opačnou tendencí.

Pro mykoplazmy je charakteristická absence buněčné stěny, redukováná velikost genomu (500 až 1500 kbp) s nízkým poměrem guaninových a cytozinových párů bází (23 – 40mol%) a přibližně desetinásobným množstvím kodonů pro tryptofan než je obvyklé. Zapříčiněno je to především záměnou čtení stop kodonu TGA za kodon TGG, určující tryptofan (Nicholas a kol., 2008).

Mnoho mykoplazem disponuje reaktivně nápadnou dynamikou svých chromozomů, která je zapříčiněna častými opravami vláken při replikaci či rekombinaci. Vysokofrekvenční změny jsou asociovány s antigenně-fázovými variacemi, které regulují produkci faktorů kritických pro patogenezi onemocnění (Dybvig a Voelker, 1996).

Mykoplazmy se nevyskytují pouze u volně žijících, ale též hospodářsky a produkčně využívaných druhů zvířat, např. koz, prasat, ovcí, skotu, ryb a drůbeže (Benčina a kol., 2003; Nicholas a kol., 2008; Matucci a kol., 2023; Mugunthan a kol., 2023). Mezi závažná onemocnění drůbeže patří především zánět spojivek, vzdušných vaků a paranasálních dutin, nebo chronická respirační nemoc (CRD – chronic respiratory disease). Všechna tato onemocnění jsou způsobena patogenním druhem: *Mycoplasma gallisepticum* (Alms a kol., 2023; Mugunthan a kol., 2023).

2.1.1 *Mycoplasma gallisepticum*

Mycoplasma gallisepticum (MG) je běžným patogenem volně žijících ptáků, jako jsou vrabci, vrány, pěvci, holubi, bažanti, křepelky a koroptve (Allen a kol., 2018). Přímý

kontakt volně žijících ptáků s domestikovanou drůbeží v rámci otevřených chovů zapříčiňuje přenos a šíření bakterie. Mnoho autorů se shoduje na tom, že nejproblematičtější je nákaza u kura domácího a krůty domácí, kde kromě snížení obranyschopnosti jedinců, dochází k ekonomickému úpadku vzhledem k poklesu snášky či zhoršené konverze krmiva (Ley, 2008; Sawicka a kol., 2020; Mugunthan a kol., 2023). Infikovaní jedinci vykazují obecně klinické příznaky jako je kašel, kýchání, nosní výtok, zduřelé infraorbitální dutiny nebo šelesty při dýchání. Přenos mezi jedinci se děje horizontálně i vertikálně.

2.1.1.1 Horizontální přenos

Horizontální přenos se uskutečňuje přímým či nepřímým kontaktem zdravých jedinců s infikovanými. Infekce se může dostat do organismu přímo prostřednictvím horních dýchacích cest anebo spojivek, a to formou aerosolů nebo kapének. Nepřímý přenos může být realizován prostřednictvím rozbitých skořápek v líhních nebo krmítkách. S ohledem na zbytkové materiály je *MG* detekovatelná v některých případech i na opadnutém peří či v krmivech. Některé publikace poukazují i na přenos prostřednictvím rukou ošetřovatele, neboť i zde mohou mykoplazmy přežít (Ley, 2008; Chen a kol., 2012; Elliott a kol., 2019; Jiang a kol., 2021). Jediným způsobem omezení šíření nákazy v chovech je správné zacházení a přísné hygienické podmínky.

Podle Ley (2008) lze horizontální šíření rozdělit do čtyř základních fází jdoucí bezprostředně po sobě.

Latentní fáze je prvním stupněm infekce a trvá 12 až 21 dní, než jsou protilátky detekovatelné v závislosti na procentuálním zastoupení očkované drůbeže. Následuje druhá fáze, období 1–21 dní, ve kterém se infekce objevuje u 5-10 % populace. Ve třetí fázi, která trvá až 32 dnů, se vytvářejí protilátky až u 95 % jedinců v populaci. V poslední fázi, dlouhé 3-19 dní, je infikováno i zbylých 5 % v populaci.

2.1.1.2 Vertikální přenos

Mugunthan a kol. (2023) zmiňují, že vertikální přenos je realizován prostřednictvím infikovaných vajec. Přenos na potomstvo pravděpodobně vzniká v důsledku respirační infekce slepic, přímým kontaktem břišních vzdušných vaků a vejcovodu. Očekává se, že míra přenosu se bude lišit v různých podmínkách, mezi jedinci a v různých časech. Nejvyšší míra přenosu byla zjištěna během akutní fáze nemoci, kdy množství *MG*

v dýchacích cestách dosahuje svého maxima (Armour a Ferguson-Noel, 2015; Matucci a kol., 2020; Huang a kol., 2021).

2.1.1.3 Diagnostika

Existují dvě metody používané k potvrzení diagnózy infekce *MG*: izolace organismu v médiích, nebo přímá detekce DNA v infikovaných tkáních a roztěrech. Běžně používané sérologické techniky pro diagnózu mají omezení v rozlišení mezi protilátkami vyvolanými spontánní infekcí a těmi vyvolanými očkováním. Minimální doba kultivace potřebná pro izolaci *MG* trvá minimálně 21 dní a může být ztížena růstem jiných bakterií. K potvrzení správnosti izolace se provádí potvrzovací test na hemaglutinační inhibici, protože mohou nastat nespecifické falešné aglutinační reakce, zejména po podání inaktivovaných vakcín nebo infekci *Mycoplasma synoviae* (Abdelrahman a kol., 2021).

Pokroky v molekulární biologii poskytly rychlou a citlivou alternativu k tradičním kultivačním metodám, které vyžadují specializované postupy a drahé reagensy. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a multiplexní real PCR jsou některé z molekulárně diagnostických postupů používaných k identifikaci mykoplazem. Použití ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) testu se využívá v některých zemích jako primární potvrzovací test. Bakteriální izolace se používá k monitorování infekce *MG* spolu se sérologickými a genetickými testy (Matucci a kol., 2020; Limsatanun a kol., 2022). V České republice je primárním a jediným povinným testem rychlá skličková aglutinace, která spočívá ve vytvoření aglutinátu v podobě vloček nebo zákalu v případě, že dojde k reakci mezi protilátkami ze séra a antigenním roztokem (Papoušková a kol., 2020).

Molekulárně genetické metody, jako typování více lokusů (MLST) a sekvenování, a důležité faktory spjaté se stabilitou genomického templátu by mohly pomoci rozlišit až šest očkovacích kmenů, ale jsou časově náročné. K detekci specifické ptačí DNA mykoplazem se obvykle používá real time PCR a konvenční PCR místo kultivace, ale tyto dvě PCR techniky mohou detekovat pouze druhy ptačích mykoplazem nebo umožnit současnou identifikaci *M. gallisepticum* a *M. synoviae* (více v kapitole 2.2 - Molekulární detekce).

2.1.1.4 Virulence

MG kóduje širokou škálu proteinů, které se chovají jako virulentní, adhezivní proteiny, lipoproteiny, heat shock proteiny a antigenní variace proteinů. Studie (Papazisi a kol., 2002; May a kol., 2006; Noormohammadi, 2007, Pflaum a kol., 2018; Yu a kol., 2019) ukazují, že každý z virulentních faktorů prokazuje specifickou roli v patogenezi a imunitní indukci.

Jednou z nejdůležitějších funkcí je adheze a míra afinity k buňkám respiračního ústrojí drůbeže. Připojení k hostitelské tkáni je realizováno pomocí speciální struktury, kterou *MG* vytváří a připomíná zužující se váček. Na povrchu této struktury hrají primární roli proteiny *GapA* a *CrmA* (kódovány stejnojmennými geny), které zajišťují připojení mykoplazmat k hostitelské buňce (Papazisi a kol., 2002). Analogem těchto proteinů je u druhu *Mycoplasma pneumoniae* protein *P1*, který se může nacházet i u člověka (Seto a kol., 2005). Kromě cytoadhezních proteinů by mohly být pro adhezi důležité i fibronectin vázající proteiny jako je *plpA* a *Hlp3*, nebo protein *OsmC-like*, který se váže na heparin (May a kol., 2006).

Neméně důležitou funkcí u každého patogenu je schopnost obelstít či přímo nadmíru zaměstnat imunitní systém hostitele. Únik před imunitou hostitele řídí genová rodina *vlhA*, která se nachází v pěti lokusech. Hlavní funkce této genové rodiny spočívá ve vytvoření antigenní diverzity, napomáhající se vyhnout imunitním faktorům v průběhu infekce. Proteiny *vlhA* jsou exprimovány ve všech fázích infekce (Pflaum a kol., 2018). Zajímavým faktem je, jejich fázová variace v různých stupních nákazy, kterou zvyšují šanci na přežití patogenní *MG* v hostitelském organismu. Dílčí mechanismy těchto fázových variací jsou základní genetické přestavby – genová konverze, rekombinace na specifických místech nebo reciproká rekombinace, avšak celkový mechanismus změn nebyl doposud plně prozkoumán (Noormohammadi, 2007). Dalším proteinem, který podléhá fázové variaci, je protein *pvpA* (putative cytoadhesion-related protein). Jedná se o protein včleněný do membrány *MG*, který napomáhá cytoadhezi hostitelských buněk. Tento protein má svůj analog u druhů *Mycoplasma pneumoniae*, označovaný jako *P30* nebo *P32* (Boguslavsky a kol., 2000).

Heat shock proteiny jsou struktury, které chrání především před tepelnými šoky, záněty a infekcí. Napříč těmito proteiny je u *MG* známý protein *GroEl*, známý i pod označením *Hsp60*. *GroEl* je identifikován jako virulentní protein a podporuje adhezi k hostitelské buňce (Yu a kol., 2019).

2.1.1.5 Prevence a léčba

Nejlepším způsobem, jak předejít vertikálnímu přenosu nebo přenosu v líhních, je získání neinfikovaných jedinců drůbeže a oplozených vajec. V případě nezáměrného zavlečení mykoplazem do chovů je doporučeno řídit se přísnou biosecurity nebo zavést preventivní strategie, které minimalizují dopad na chovanou drůbež. Využívaným prostředkem prevence se stává pravidelná desinfekce a efektivní monitorovací systém, který může pomoci předcházet, případně držet infikované jedince pod kontrolou.

V některých zemích producenti drůbeže využívají antibiotika jako preventivní ochranu a léčivo pro infikované jedince hejna. Mezi nejpoužívanější antibiotika se v tomto případě řadí pleuromultiliny, makrolidy, fluorochinolony a tetracykliny (El Gazzar a kol., 2011). Nutnou podmínkou pro užívání léčiv, je zohlednění rychlé adaptace kmenů mykoplazem na používaná antibiotika. Ačkoliv *MG* nemá buněčnou stěnu a výběr antimikrobiálních látek je omezen, rezistence u patogenů se navzdory rozumnému užívání může vytvořit. Dalším skrytým problémem je způsobení zdravotních komplikací u člověka a navození částečné odolnosti či úplné rezistence vůči použitému druhu antibiotika. Z tohoto důvodu našly v praxi využití inaktivované i živé vakcíny. Úplná imunita u ptáků proti *MG* neexistuje, nicméně vakcinace se jeví jako nejlepší způsob, jak omezit závažnost onemocnění na minimum. Mezinárodní spolupráce se zaměřuje na minimalizaci používání antibiotik v hejnech a jejich nahrazení adekvátními vakcínami a vakcinačními programy (Silley a kol., 2012; Mungunthan a kol., 2023).

2.1.1.6 Vakcíny

Ferguson-Noel a kol. (2012) uvádí, že Adler a jeho tým doporučoval vakcinaci proti *MG* již v šedesátých letech jako kontrolní zhodnocení mykoplazmózy. Od této doby se na vývoji vakcín pracuje, nicméně jejich výroba je ztížena kvůli nehomogennímu účinku na vakcinovanou drůbež a poměrně rychlé ztrátě své účinnosti. Ley (2008) rozděluje vakcíny na dva základní typy: neživé a živé.

Neživé vakcíny se dostaly do podvědomí v sedmdesátých letech dvacátého století, kdy se jeví jako skvělý prostředek pro vymýcení endemických infekcí. Své místo na trhu tak dostaly vakcíny, založené na usmrcených bakteriích *MG* v olejových emulzích (tzv. bakteriny), chránící především kuřata před intra-sinusovou expozicí. Bylo též zjištěno, že bakteriny mohou chránit brojlery před zánětem vzdušných vaků a nosnice

před poklesem snášky (Ley, 2008). Samy o sobě infekci neeliminují, nicméně přispívají významně k její redukci. Pro zvýšení účinnosti jsou zamýšleny obměny z hlediska adjuvans či antigen-doručovací systémů, zahrnující například lipozomy nebo sulfonované polysacharidy (Ley, 2008). Vzhledem k faktu, že se jedná o neživé vakcíny, není potřeba zavádět přísná bezpečnostní opatření, která by omezovala chovatele. Naopak svou nevýhodu skrývají v několika povinných aplikacích, a s tím spojenou finanční zátěží. Zejména finanční stránka vakcinace je důležitou otázkou, mnozí chovatelé se tak obracejí na druhou alternativu vakcinace: živé vakcíny.

Živé vakcíny jsou založeny na oslabených izolovaných kmenech *MG*. Oproti neživým vakcínám nabízí širokospektrální ochranu před rozvojem infekce, nevyžadují mnohonásobnou aplikaci a jsou cenově dostupnější. V současné době je k nalezení na trhu několik kmenů, na kterých jsou vakcíny založeny. Jedná se o kmeny F, 6/85, ts-11, K a R.

Kmen F (Connecticut F strain) je mírným kmenem, který byl zprvu využíván v ozdravných programech imunizace mladých brojlerů. Mnozí autoři (Lin a Kleven, 1984; Branton a Deaton, 1985; Ferguson-Noel a kol., 2012) se shodují, že použití tohoto kmene mělo pozitivní výsledky vzhledem ke snášce infikovaných jedinců, ochranu vůči zánětu vzdušných vaků. Výhodou tohoto kmene je vysoká míra přenosu (vertikální i horizontální) a různorodost aplikačních prostředků (skrze oční kapky nebo různé druhy intranasálních nebo klasických sprejů). Vakcína je obecně aplikována drůbeži ve věku 8-14 týdnů, nicméně pokud hrozí riziko infekce, je možné vakcinační plán urychlit až o dva týdny (Ley, 2008).

Studie vakcíny kmenu 6/85 prokázaly u kuřat a krůt minimální virulenci, minimální přenosnost a odolnost vůči infekci virulentním kmenem *MG*. Obecně je aplikována aerosolovým postřikem, při kterém dochází k maximalizaci požadovaného účinku, a detekovatelná může být v horních dýchacích cestách po dobu až 8 týdnů po vakcinaci. Serologickou odpověď vyvolává pouze minimálně nebo vůbec. Komerčně dodávaný kmen je ve formě vysušených zmražených pelet rozpuštěných ve vodě, které se v jedné dávce podávají drůbeži ve věku od šesti týdnů (Evans a Hafez, 1992).

Vakcína na bázi kmene ts-11 vznikla jako výsledek chemické mutagenese a selekce pro citlivost na teplotu (33°C). Vyznačuje se minimální nebo žádnou virulencí vůči kuřatům a krůtám, je slabě horizontálně přenosná, stimuluje pomalou rozvojovou reakci a nízkou úroveň detekovatelných protilátek navozujících ochranu proti *MG*. V očkováných hejnech přetrvává po celý život a navozuje dlouhotrvající imunitu.

V experimentálních studiích očkování mladých slepic nebyl zaznamenán žádný negativní vliv na produkci či kvalitu vajec (Barbour a kol., 2000). Dobré výsledky byly prokázány i při očkování masných brojlerů, kteří vykazují lepší produkční výkonnost (Vance a kol., 2008). Vakcína je dodávána jako zmrazená suspenze, podávána v jedné dávce do oka dospívajícím jedincům ve věku od 9 týdnů, nejméně 3 týdny před očekávaným vystavením patogenu (Ley, 2008). Nicméně Gaunson a kol. (2006) ve své práci zmiňují, že vakcína ts-11 je bezpečná a účinná v předcházení závažných onemocnění po expozici virulentním kmenem již ve stáří 1-4 týdnů. Někteří autoři (El Gazzar a kol., 2011) varují i před možnou reverzí na virulentní kmen v terénních podmínkách a ziskem potenciálu pro vertikální přenos. Vzhledem k možné reverzi byl vyvinut kmen ts-304, varianta kmenu ts-11, s více protektivním charakterem a nižší pravděpodobností konverze do virulentního kmenu (Kanci Condello a kol., 2020).

Vakcína kmenu K je přirozeně se vyskytující avirulentní kmen *MG*, jejíž bezpečnost potvrdily mnohé studie (Raviv a kol., 2008; Ferguson-Noel a kol., 2012). Perzistence v horních dýchacích cestách je odhadována přibližně na pět měsíců, kde chrání kuřata proti tracheálním lézím, způsobených *MG*. Ferguson-Noel a Williams (2015) uvádí, že tato vakcína je srovnatelná v ochraně s vakcinačními kmeny ts-11 a F.

Počátek vakcíny kmenu R (a jeho současných variant) sahá až do šedesátých let 19. století, kdy byl izolován jako patogenní kmen *MG*. Od této doby je kultivován a jeho pasážované formy (R_{low} a R_{high}) se využívají k výzkumu. Studie na těchto dvou formách vakcín prokázala, že forma R_{low} je schopna cytoadherence, průniku do buněk a je patogenní, zatímco R_{high} vykazuje sníženou kapacitu oproti R_{low} (Ley, 2008). Současné kmeny vakcín mají svůj původ jak v populaci R_{low} (*MG* 7), tak v R_{high} (*GT5*). Experimentální vakcinační studie prokazují, že oba kmeny dokážou ochránit drůbež před masivní kolonizací průdušnice a případnými lézemi, způsobené *MG* (Gates a kol., 2008).

Slibným průkopníkem ve vývoji vakcín jsou vakcíny vzniklé rekombinací za pomoci genetického inženýrství. Tyto přípravky mají základ v přesné identifikaci a klonování imunogenních faktorů, zasazených do odpovídajících expresních systémů. Jako příklad si lze uvést transpozony: *Tn916* a *Tn4001*, které byly využity pro tvorbu mutantních linií mykoplazem, studium genové exprese a proteomiky. V současnosti existují dvě rekombinantní vakcíny, které pracují s oslabenými a geneticky upravenými nosiči, a to *GT5* a virus ptačích neštovic s vybranými geny *MG* (Gates a kol., 2008). V dalších studiích (Zhang, 2018) bylo zjištěno, že při použití rekombinantního

adenoviru k expresi S1 proteinu (též jako *S protein* nebo *spike protein*) infekční bronchitidy (*IBV*) a *TM-1* proteinu *MG* v linii buněk *HEK293*, dochází po expozici s *IBV* a *MG* k expresi cílových proteinů, zvýšení produkce protilátek a zmírňování klinických příznaků a lézí.

2.1.2 Příbuzné druhy

Mykoplazmární druhy jsou si svým výběrem hostitelského organismu podobné a osidlují totožné druhy tkání. Níže jsou uvedeny druhy ptačích mykoplazem, které lze očekávat ve směsných vzorcích. Literární přehled je doplněn i o jeden druh mykoplazmy, která není spjata s drůbeží, avšak její laboratorní vzorek byl začleněn do výzkumu specifity navržených primerů (více v kapitolách Materiál a metody, a Výsledky).

2.1.2.1 *Mycoplasma synoviae*

Mycoplasma synoviae (*MS*) je významným ptačím (drůbežím) patogenem, který se podílí na projevení chronických dýchacích obtíží, jako je zánět vzdušných vaků nebo synovitida (zánět kloubních membrán). Tyto indispozice mohou vést ke snížené snášce, případně snížené kvalitě vajec. V porovnání s *MG* je *MS* infekčnější, nicméně nezpůsobuje smrt ptáků přímo, většinou se tak děje ve spojení s dalšími patogeny, které hostitelský organismus limitují. Jedná se např. o ptačí reovirus (*ARV*), Newcastle disease virus (*NDV*), *Escherichia coli* a virus infekční bronchitidy (*IBV*) (Zhang a kol., 2023).

Vzhledem k závažnosti výskytu tohoto druhu mykoplazmy, byla navržena a vyvinuta široká škála vakcín, které mají za úkol zmírnit negativní dopad na zdraví zvířat a ekonomiku chovů. V současné době lze na trhu nalézt k zakoupení např. vakcínu *MS-H* (*Vaxsafe MS®*), perorální roztok *Doxyron* (*Sevaron s.r.o.*) nebo *Uni-Tiamulin* (*Uni-Vit s.r.o.*).

2.1.2.2 *Mycoplasma meleagridis*

Mycoplasma meleagridis (*MM*) je hlavním mykoplazmárním druhem osidlující respirační trakt krůt. Obdobně jako příbuzné druhy (*MG*, *MS*), ovlivňuje negativně zdravotní stav drůbeže. Na rozdíl od příbuzných druhů ovlivňuje negativně i růst nakažených embryí, což může způsobit tvorbu kosterních abnormalit. Působení patogenní

bakterie *MM* může ve výjimečných případech vykazovat příznaky infraorbitální sinusitidy nebo způsobit smrt hostitele v rané fázi života (Mourad, 2023).

2.1.2.3 *Mycoplasma anatis*

Mycoplasma anatis (*MA*) je vnitrobuněčným bakteriálním patogenem především vodní drůbeže. Přítomnost tohoto druhu v respiračním nebo rozmnožovacím traktu znamená pro hostitele problémy, jako je např. infraorbitální sinusitida, zánět vzdušných vaků nebo zánětlivé zarudnutí pohlavních cest zvířete. Na rozdíl od příbuzných druhů (*MG*, *MM*, *MS* a další) může ovlivnit činnost pobřišnice a způsobit její zánět (případně zánět přilehlých orgánů) (Zhou a kol., 2021).

2.1.2.4 *Mycoplasma imitans*

Mycoplasma imitans (*MI*) je ptačím mykoplazmárním druhem, který byl objeven jako jeden z posledních. Důvodem je podobnost s *MG*, a to nejen v rámci vizuálně – fyziologických znaků infekce (biochemické reakce, hemadsorpce, hemaglutinace), ale ve způsobu detekce (imunofluorescence, růstově-inhibiční test). Studie (Bradbury a kol., 1993) zaměřená na DNA hybridizaci divokých kmenů *MG* a *MI* poukazují na fakt, že navzdory podobným znakům se homologie *MG* a *MI* na úrovni DNA pohybuje mezi 40-46 %. *MI* v porovnání s *MG* způsobuje v hostitelském organismu hlavně ciliostázu (potlačení nebo zastavení činnosti buněčných řas) a respirační problémy mírnějšího průběhu (Kleven a Ferguson-Noel, 2008).

2.1.2.5 *Mycoplasma pulmonis*

Mycoplasma pulmonis (*MP*) je na rozdíl od ostatních mykoplazmárních druhů přítomna v dýchacím traktu hlodavců, kde se společně s dalšími patogeny: *Streptococcus pneumoniae* (Klein, 1884), *Pseudomonas aeruginosa* (Schröter, 1872) podílí na rozvoji murinní respirační mykoplazmózy (MRM). V rámci své progresivity je schopna se dostat i do reprodukčního traktu a ovlivnit správnou funkci vaječnicků. Podobně jako u ptačích druhů jsou klinické projevy u mladších jedinců méně patrné než u starších a citlivost na antibiotika je značně snížena (Graham a Schoeb, 2011).

2.2 Molekulární detekce

Molekulárně diagnostické techniky jsou běžně využívány jako jedny z nejspolehlivějších nástrojů pro screening diverzity jedinců a populací, mykoplazmy nevyjímaje. Oproti klasickým nepřímým detekčním metodám, jsou rychlejší, levnější, přesnější, průkaznější a v neposlední řadě i snadněji optimalizovatelné. Ley (2008) navrhuje zkombinovat molekulárně diagnostické techniky se serologickými, aby došlo k prokazatelné detekci *MG* či mykoplazmám podobným patogenním organismům. Problémem však bývá finanční náročnost, která může být pro výzkum oběma směry limitující.

2.2.1 Metody molekulární detekce

Současná molekulární detekce *MG* je opřena o různé varianty PCR – multiplex (mnohonásobná), real time (v reálném čase), MAMA (nesouhlasná mutační), či MLST (typizace sekvencí několika lokusů), které pomáhají k rapidní identifikaci či ke zjišťování bodových mutací. Nevýhodou však bývá optimalizace metod, která je časově náročná, či poměr vstupních reagensů, které ovlivňují výsledek zkoumání.

2.2.1.1 Multiplex PCR (mnohonásobná PCR)

Multiplex PCR je molekulárně diagnostickou metodou, která spočívá v syntéze DNA vláken za pomoci enzymu DNA-dependentní-DNA-polymerázy. Na rozdíl od klasické PCR, kde je využito pouze jednoho páru primerů, se zde využívá hned několika párů primerů, které mají podobné teplotní rozmezí v rámci nasedání primerů na mateřské vlákno. Lze tak dosáhnout většího množství produktů v jediné reakci, než je u klasické PCR možné. Nevýhoda této metody se skrývá v nespecifickém nasedání primerů na templátové vlákno či autokomplementace párů primerů (nebo jejich částí) mezi sebou, čímž se efektivita metody snižuje. Při použití multiplex real time PCR je doporučeno volit k detekci tolik párů primerů, aby výsledný signál při čtení značených sond byl odlišitelný.

2.2.1.2 Real time PCR (PCR v reálném čase)

Real time PCR je považována za základní detekční metodu umožňující kvantifikaci DNA vláken, syntetizovaných DNA-dependentní-DNA-polymerázou. Kvantifikace produktu je zaznamenávána speciálním typem termocycleru, který dokáže rozpoznat

množství syntetizovaného produktu v závislosti na intenzitě fluorescence substrátu. Děje se tak při překročení hranice, která je označována jako *threshold*. Cyklus, ve kterém dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, se označuje jako *cycle of threshold* (C_t). Hodnota C_t souvisí se vstupní koncentrací templátové DNA a obecně platí, že čím nižší je hodnota C_t pro danou reakci, tím větší množství templátové DNA bylo do reakce dodáno. Substrát samovolně nevykazuje fluorescenci, tj. musí být záměrně značen, proto je využívána široká škála technologie značení. Nejčastěji se využívá technologie: SYBR Green I, Molecular Beacon, TaqMan, Scorpion a FRET.

Kvantifikace získaných signálů může být prováděna relativně vzhledem k množství fluorescence mezi vzorky. Kvantifikaci lze provést i absolutně, nicméně je zde nutností předem zkonstruovat standardní kalibrační křivku, podle které je odvozeno množství získané DNA. Při kvantifikaci je nezbytné zhodnotit i možné nestejně vstupní množství materiálu prostřednictvím vnitřní kontroly. Jako vnitřní kontrola jsou použity referenční geny tzv. *housekeeping geny*, které se prokazatelně vyskytují v genomu v jedné kopii.

V průběhu reakce lze odhalit i vznik nespecifických produktů prostřednictvím křivky tání tzv. *melting curve*, která využívá teplotní specificitu pro různé fragmenty vzniklé PCR reakcí. Nespecifické produkty obvykle mívají odlišnou teplotu tání než produkty specifické. Pokud má křivka tání pouze jeden vrchol (peak), reakce je specifická. Pokud má křivka dva a více vrcholů (peaků), pak v průběhu reakce vznikají i produkty nespecifické. Křivku tání obvykle zobrazuje software dodaného cycleru, není jí tedy nutné konstruovat ručně (LABGuide, 2020).

2.2.1.3 Mismatch amplification mutation assay (nesouhlasná mutační PCR, MAMA-PCR)

Nesouhlasná mutační PCR je založena na principu klasické PCR, s rozdílem v počtu použitých primerů. V MAMA-PCR je použit jeden přímý (forward) a dva zpětné (reverse) primery, z nichž jeden obsahuje chybné párování jednoho nukleotidu na 3' konci. Neshoda jednoho z reverzních primerů na 3' konci (těsně před posledním nukleotidem) by neměla mít žádný nebo jen velmi malý vliv na amplifikaci genů během PCR za předpokladu, že v cílovém lokusu nedojde k mutaci. Geny divokého typu (dále již jen jako „*wild type genes*“), které běžně mutace obsahují, mohou být tak účinně amplifikovány. Bodová mutace cílového genu však vytváří další nesouhlasné párování

mezi primerem a templátovým vláknem během procesu amplifikace. Následná neshoda generovaná na 3'-OH konci způsobuje, že Taq DNA polymeráza není schopna prodloužit primer pro další amplifikaci. Dvojitá neshoda na 3'-OH konci zodpovídá za zastavení procesu amplifikace PCR.

MAMA-PCR primery mohou být navrženy tak, aby cíleně amplifikovaná oblast obsahovala specifickou mutaci a amplifikace *wild types genes* neproběhla, nebo naopak, aby *wild type genes* byly amplifikovány a oblast obsahující specifickou mutaci nikoliv. Z tohoto důvodu je návrh PCR primerů důležitým procesem a všechny aspekty jako je citlivost a specifita techniky pečlivě zváženy (Deekshit a kol., 2019).

Jako efektivní modifikace MAMA-PCR se jeví analýza pomocí křivky tání, tzv. melt-MAMA. Tato modifikace se projevila jako vylepšení stávající metody, protože poskytuje flexibilitu v úpravě reakčních podmínek a je pracovně i finančně efektivní. Přesná genotypizace probíhá v rozsahu DNA přibližně 100 ng - 0,1 pg. Přesnost a úspěšnost návrhu melt-MAMA analýzy je srovnatelná s testy Dual Probe TaqMan, avšak z hlediska všestrannosti, hospodárnosti a rychlosti vývoje poskytuje melt-MAMA kvalitnější výsledky. Na druhou stranu je melt-MAMA méně robustní než Dual Probe TaqMan, proto je nutné pečlivě zvažovat všechny možné reakční kroky (Birdsell a kol., 2012).

2.2.1.4 Multi-locus sequence typing (MLST, sekvenování více lokusů)

Metoda sekvenování více lokusů (dále již jen jako MLST) je jednou z pokročilejších laboratorních technik, která zahrnuje sekvenování několika genových úseků, s účelem identifikace jejich alelových variant. Nejprve jsou vybrané geny podrobeny sekvenování a získané sekvence přiřazeny do alelových typů. Kombinací alelových typů je vytvořen sekvenční typ, který je analogem haplotypu a vytváří celkový alelový profil sledovaných genů.

Klíčový faktor u techniky MLST je najít ideální marker, který by měl být univerzální vzhledem k taxonům organismů použitých ve vzorcích. Dále by měl být lehce amplifikovatelný a variabilní pro maximalizaci rozlišovací schopnosti druhů a kmenů. Vzhledem k vysoké citlivosti lze tuto metodu použít nejen v populačních, ale též např. epidemiologických studiích (Jánová, 2023).

Výhodou techniky MLST je snadné použití u haploidních organismů, u kterých odpadá problém s heterozygoty. Roman a kol. (2018) poukazuje na fakt, že technika

MLST není dominantně používána jen u haploidních organismů, ale lze ji využít i k odlišení různých kmenů diploidních parazitů.

Metodu lze využít při detekci nejen *housekeeping genů*, které jsou nezbytné pro správné fungování buňky jako celku, ale i několika dalších, které v sobě kódují druhotně specifické proteiny. Mezi takové zájmové geny je zařazeno například: *atpG*, *crm*, *dnaA*, *dppC*, *fusA*, *gapA*, *glpK*, *hlp2*, *lpd*, *mgc2*, *mraW*, *parE*, *plpA*, *plsC*, *potC*, *rpoB*, *ruvB*, *scpA*, *ugpA*, *uvrA*, *vlhA*, *16S rRNA*, *23S rRNA*.

- *Gen mgc2*

Jedním z nejvíce prokoumaných genů pro detekci druhu *MG* je gen *mgc2* (identifikován jako kódující oblast CDS MGA_0932; evidovaný v databázi NCBI jako NC_018406.1). Tento gen kóduje strukturální protein (cytadhezin) nacházející se na vnější straně membrány a jeho úlohou je adheze mykoplazmy k hostitelské buňce. Světová zdravotnická organizace pro zdraví zvířat (WOAH) doporučuje používání *mgc2*-PCR protokolů pro správnou detekci *MG* v klinických vzorcích (Matucci a kol., 2023).

- *Gen plpA*

Úlohou genu *plpA* (pneumoniae-like protein) je tvorba proteinu, schopného vázat extracelulární protein matrixu – fibronectin. May a kol. (2006) uvádí, že cytoskeletální proteiny ostatních druhů mykoplazem, které mají podobnou funkci jako protein kódovaný genem *plpA* (např. MGA_1199 nebo MGA_0928 z druhu *M. pneumoniae*), vykazují vysokou míru homologie. Mnoho autorů (Dehio a kol., 2000; Herrmann a kol., 1988; Nyberg a kol., 2004) poukazuje na souvislost fibrinogenu a patogenů vyhýbající se imunitnímu systému hostitele, tvoření biofilmů, zprostředkování cytoadherence nebo vniknutí do buněk hostitele. Je tedy logické předpokládat, že tyto proteiny jsou u druhu *MG* významným membránovým nástrojem, který dovoluje infiltrovat zdravé buňky.

- *Gen potC*

Lokus *potC*, odkazuje na konzervovaný motiv RNA, který se nachází na předpokládaných 5' koncích netranslatovaných oblastí genů (uvedeno v databázi NCBI jako NC_018406.1; lokus HFMG94VAA_RS02580). U těchto genů je předpokládáno, že kódují membránové transportní proteiny nebo enzymy, které zajišťují ochranu před účinkem peroxidů tzv. peroxiredoxiny. Nicméně byla vyslovena i hypotéza, že *potC*

RNA mohou fungovat jako cis-regulační prvky, nicméně podrobná funkce není doposud známa. (Weinberg a kol., 2010).

- Gen *glpK*

Glycerol kináza (*glpK*) je jednou z možností, jak úspěšně detekovat druh *MG* (uvedeno v databázi NCBI jako NC_018406.1; kódující lokus HFMG94VAA_RS00080). Jejím úkolem je katalyzování přenosu fosfátové skupiny $(\text{PO}_4)^{3-}$ na glycerol, aby mohl být vytvořen glycerol-3-fosfát a z něj metabolickou cestou glukóza. Laboratorní testy prokazují, že kromě genu *mgc2* je tato oblast vhodná pro detekci.

- Gen *vlhA*

Úlohou genu *vlhA* (v databázi NCBI jako NC_017502.1, kódující lokus: MGAH_RS01990) je tvorba lipoproteinu, který ovlivňuje imunitní systém, podněcuje zánět a podporuje schopnost úniku. *VlhA* funguje jako adhezín, který se váže na receptory obsahující kyselinu sialovou v glyko-konjugátech buněčného epitelu, což má význam pro patogenitu. Ve srovnání s ostatními geny, významných pro patogenitu *MG*, je uveden gen *vlhA* jako jeden ze 43 genů (Maya a kol., 2024).

- Gen *pvpA*

Úsek s označením *pvpA* (uvedeno v databázi GenBank jako FJ972631; kódující lokus stejné označení jako databáze GenBank) kóduje protein tvořící součást povrchové struktury membrány. Vyniká výraznou variabilitou v expresi a velikostí mezi různými kmeny. Za použití elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že *pvpA* je lokalizován na terminální špičkové struktuře (Hashemi a kol., 2018). Různé polymorfismy a změny v sekvencích genu *pvpA* jsou zodpovědné za variabilitu velikosti tohoto proteinu u různých kmenů *MG* a za fázově proměnlivou expresi (Jiang a kol., 2009).

2.2.2 Celogenomová data

Portál NCBI je jedním z nejpoužívanějších světových informačních uložišť, týkající se biomedicínského výzkumu a bioinformatiky. Obsahuje záznamy o sekvencích nukleových kyselin a nástroje k jejich porovnávání, volně dostupný seznam chemických látek včetně jejich vlastností a biologických aktivit nebo databázi vědeckých článků a abstraktů. Aktualizace jednotlivých komponent NCBI probíhá na denní bázi a soubory

záznamů nukleových kyselin, např. genové anotace, lze ve většině případů porovnávat mezi dvěma databázemi (zde RefSeq a GenBank), díky nimž může uživatel vybrat data o vyšší kvalitě (případně kvantitě).

2.2.2.1 Referenční genom

Záznamy o referenčním genomu *MG* (uvedeno v databázi NCBI jako kmen VA94_7994-1-7P; RefSeq: NC_018406.1) byly získány metodou sekvenování nové generace – Illumina GAI sekvenování, obousměrným čtením (paired-end) fragmentů dlouhých 36 nukleotidů. Pro výstupní data byl použit algoritmus OLC (konsensusní uspořádání překrývajících se sekvencí) *de novo* i vůči sestaveným templátům s nastavenou minimální hloubkou čtení 150 bp (Tulman a kol., 2012).

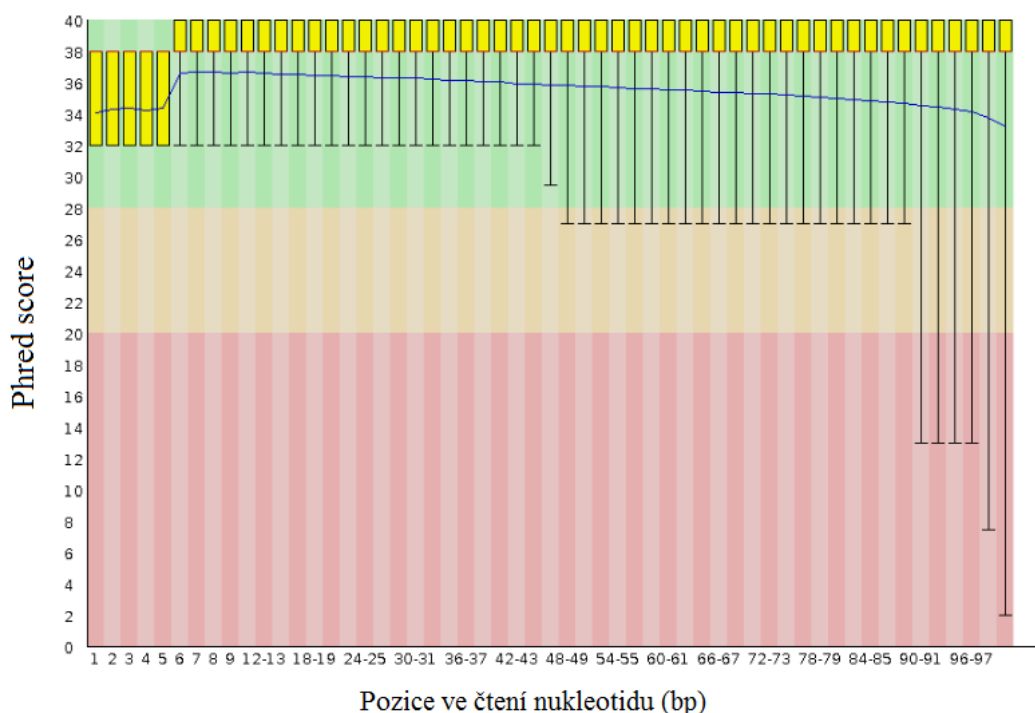
Sekvence referenčního genomu uvádí celkové množství 789 genů rozprostřených po jednom chromozomu dlouhém 964 110 bp. Tento chromozom lze v základu rozčlenit podle orientace vlákna (plus/minus¹) nebo charakteru známosti genů (přiřazené/nepřiřazené funkce). Poměr počtu hypotetických ku určených genů na plusovém vlákně je 86:324. Poměr počtu hypotetických ku určených genů na minusovém vlákně je 81:298. Zajímavým faktem je, že tyto hypotetické úseky genů tvoří na obou vláknech přibližně pětinu z celkového odhadovaného počtu všech genů. Toto zjištění nabízí nové možnosti pro další výzkum a vývoj detekčních mechanismů.

2.2.2.2 Kvalita čtení a analýza kvality genomu

Kvalita sekvenčního čtení, vyjádřená pomocí Phred skóre, znamená specifickou úroveň, na které byly jednotlivé nukleotidy přečteny. Čím vyšší je Phred skóre, tím vyšší je pravděpodobnost správného přečtení nukleotidu. S rostoucí pozicí nukleotidu ve čtení je pravděpodobnost správného přečtení nukleotidu nižší, a tedy Phred skóre postupně klesá. V ideálním případě by se průměrné skóre při čtení pozic (modře) a mezikvartilové rozpětí (žluté boxy) měly pohybovat ve vrchní (zelené) části obrázku (Obr. č.1). Při čtení jedním směrem (single-end read) bývají získaná data obvykle kvalitní. V případě méně kvalitních dat lze dodatečně poupravit sekvence, aby se jejich kvalita zvýšila, avšak je nutno počítat se ztrátou některých dat. Při párovém čtení frag-

¹ plus = DNA udávaná ve směru 5'-3', jinak též „nepřepisovaná“ nebo „sense“
minus = DNA udávaná ve směru 3'-5', kompatibilní k plus vlákně

mentů (paired-end reads) bývá kvalitnější čtení znárožňující přímou (forward) sekvenci, než zpětnou (reverse) sekvenci. Na vině bývají sekvenční nepřesnosti, kvalita dodaného templátu, anebo síla sekvenačního signálu. Dalšími častými chybami bývají chyby vzniklé při PCR amplifikaci či přípravě sekvenační knihovny. V neposlední řadě kvalitu ovlivňují i faktory biologické, kterým se však vyhnout úplně nelze (např. methylace DNA).



Obr. č. 1 - Ilustrační obrázek závislosti pozice čtení nukleotidu na Phred skóre [zdroj: autor].

Kvalita genomu v informačním uložšti NCBI není vyjádřena skrze Phred skóre, ale skrze automatizovanou metodu pro posouzení kvality genomu – CheckM. Metoda využívá syntetických dat, široké škály dostupných izolovaných genomů a metagenomických dat skrze proces anotace prokaryotických genomů (PGAP). Chybovost, která je limitující pro dosavadní kvalitativní určení genomů, se tímto snižuje na minimum. Využíván je tzv. „model náhodného contigu“, který dokáže doplnit nedokončené genomy do plné kapacity. Právě z tohoto důvodu je využíván pro posouzení kvality genomu buněčných genomických dat s kompletností okolo 96-99,9 %. Nelze opomenout ani faktor kontaminace, který se pohybuje v desetinách procent (Parks a kol., 2015).

Referenční genom *MG* je v tomto případě charakterizován úplností z 96,54 % s percentilem 66 % a hodnotou celkové kontaminace 0,38 % (data k 1.4.2024).

2.2.2.3 Zastoupení GC páru a počtu neznámých bází

Obsah GC bází (%) je jedním z důležitých faktorů ovlivňující kvalitu genomového templátu. Vyšší obsah (nad 40 %) těchto bází obvykle značí vyšší stabilitu DNA, avšak ne všechny sekvenační technologie si dokážou spolehlivě překonat úseky s vyšším zastoupením těchto bází a může dojít k chybám. K těmto sekvenačním technologiím patří především metody sekvenování druhé generace (NGS) - Illumina či v ojedinělých případech i Oxford Nanopore Technologies.

Mykoplazmární genomy obsahují nižší procentuální zastoupení GC bází, tj. 23-40 %. Tato adaptace může být spojena s častými chromozomovými přestavbami v rámci antigenní variace v patogenní fázi onemocnění. Dále může prokazovat důvod rychlé dynamiky replikace a transkripce v rámci rychlejšího oddělování mateřských vláken. Referenční genom je tvořen dle záznamu z databáze NCBI 31,5 % GC bází.

Při čtení sekvencí může dojít k nespecifickému signálu při čtení bází. Tato tendence může být tím vyšší, čím delší je fragment určený ke čtení. Z tohoto důvodu je možno dodatečně fragmenty softwarově zkrátit, aby se kvalita čtení zvýšila.

2.2.2.4 Vyhledávání specifického senzorkého signálu

Senzorké signály vyhledávají konkrétní posloupnosti, které předpokládáme, že se nachází ve funkčních genech. Tyto signály mohou zahrnovat typické značky jako jsou start (ATG) nebo stop kodony (TAA, TGA, TAG), stejně tak, jako specifické sekvence nalezené v promotorových oblastech. Mezi takové prokaryotické sekvence patří Pribnowova sekvence (TATAAT) v DNA nebo Shine-Dalgarnova sekvence (AGGAGGU) v mRNA (web Masarykova Univerzita, 2020).

Při hledání kandidátních genů je pro úspěšnou predikci nutno využívat otevřených čtecích rámců (ORF) vzhledem k zjednodušené formě prokaryotického operonu. Kandidátní čtecí rámce jsou vybrány na základě očekávané délky ORF a výskytu jedinečných sekvencí v promotoru.

2.2.2.5 Vyhledávání unikátních sekvencí

Vyhledání unikátních sekvencí v genomu představuje velkou výzvu pro každou navrhovanou detekční metodu. Programy, které porovnávají podobné nebo konzervativní sekvence, jsou v nadbytku vůči těm, které se snaží primárně nalézt rozdíly. Z tohoto

důvodu je snaha o vytvoření funkčních a uživatelsky snadno ovladatelných nástrojů, které svými možnostmi dokážou v relativně krátkém čase poskytnout odpovídající výstupní data. Zároveň je žádoucí, aby tyto nástroje byly vytvořeny ve snadno pochopitelných programovacích jazycích.

Jedním z takových nástrojů je program GenMap (Pockrandt a kol., 2020), který byl původně zamýšlen jako výpočetní mechanismus pro mapovatelnost v rámci genomu. V rámci rozšíření schopnosti mapovacího algoritmu byl program dodatečně upraven tak, aby odhalil míru unikátnosti jakékoliv pozice/úseku (tzv. k-meru) a stanovil, jak často se v genomu vyskytuje. Relativně snadná metodika programu je zastíněna nutností pokročilých programátorských znalostí k jeho obsluze.

Na základě tohoto programu byl vytvořen porovnávací nástroj Fur (Haubold a kol., 2021), který předpokládá základní myšlenku existence odlišnosti mezi studovaným genomem a nejbližšími příbuznými genomy (označované jako *sousedy*). Dvojitě porovnání studovaného genomu a k němu *sousedních* genomů je kritické v nalezení markerových a odstranění neunikátních částí.

Nejvíce univerzálním nástrojem k hledání unikátních sekvencí je aplikace KEC (Beran a kol., 2021). Tento software využívá podobně jako GenMap tvorbu K-merů, avšak s cílem vytvořit soubor parametrů specifikovaných uživatelem. Tyto K-mery jsou uloženy v tzv. mapách, které jsou v rámci cílových a necílových sekvencí porovnány, a vedou k zisku unikátní sady K-merů přítomných pouze v cílové sekvenci. V případě unikátního charakteru sekvence jsou K-mery vráceny do jejich původních pozic za účelem zisku překryvu více takových K-merů a jejich možné spojení do větších celků. Unikátní sekvence mohou tak nabývat velikost i několik desítek tisíc nukleotidů.

3 Cíle práce

- Nalézt unikátní sekvence pro detekci druhu *Mycoplasma gallisepticum* z celogenomových dat a navrhnout pro ně specifické primery.
- Laboratorně optimalizovat metodiku detekce s využitím navržených primerů
- Laboratorně určit specificitu navržených primerů k příbuzným mykoplazmárním druhům

4 Materiál a metody

Praktická část diplomové práce se sestává z několika částí. První část se zaměřuje na návrh laboratorní detekce druhu *MG* z tkáňových stěrů chovných nosnic a následné ověření této metody na kolekci získaných vzorků. Druhá část se snaží využít navrženou metodiku k analýze směsných vzorků, která by dokázala rozlišit vakcinované od přirozeně napadené drůbeže pomocí metody real time PCR.

4.1 Identifikace unikátních sekvencí a návrh primerů

Pro získání unikátních sekvencí bylo analyzováno 20 genomů *MG* a 19 genomů *MS*, získaných z databáze GenBank (NCBI) (Tabulka I). Hlavním úkolem bylo nejprve získat sekvence, které jsou pro druh *MG* neměnné, a poté z nich vybrat takové, které mají dostatečnou délku pro možnou amplifikaci. K vyhledávání takových sekvencí byl použit program KEC (Beran a kol., 2021), který využívá vytvoření K-merů na základě porovnání cílových a necílových genomů. Vytvořené K-mery byly porovnány a spojeny do větších celků. Takto vzniklé sekvence byly považovány za unikátní pro cílový genom.

V programu KEC byly nejprve genomy rozřazeny dle funkce, kterou v analýze měly plnit. Genom *MG* pod označením *master* (GCF_000025365.1) představoval referenční sekvenci, se kterou byly ostatní genomy *MG* (*pool*) porovnány. Porovnávání probíhalo zahrnutím (*include*) *master* a *pool* sekvencí do analýzy, hodnota K-meru byla zvyšována po jednotkách z 12 až na 20. Minimální délka sekvence byla zvyšována po stovkách bází z 200 až na 1000 bází. Z těchto dat byly získány sekvence (*target*), ze kterých byly porovnáním s necílovými genomy (*non-target*) vyřazeny (*exclude*) úseky společné pro *MG* a *MS*.

Vyřazování sekvencí proběhlo pro každý výsledek variace K-meru a minimální délky sekvence s následujícími parametry: minimální délka požadované unikátní sekvence byla stanovena na 5000 bází, délka K-meru byla stanovena na hodnotu 20² a navíc byla přidána funkce porovnávání reverzně-komplementárních sekvencí. Z těchto výsledků bylo vybráno sedm úseků, jejichž porovnání s databází GenBank prostřednictvím nástroje BLAST, neprokázalo podobnost k žádné z příbuzných druhů mykoplazem. Na tyto úseky byly v následujícím kroku navrženy primery.

² minimálně 1 z 20 nukleotidů se musel prokazatelně lišit od referenční sekvence

Návrh primerů probíhal v aplikaci Primer3 4.1.0 (Untergasser a kol., 2012; Kossaar a Remm, 2007). Ze 105 softwarově navržených párů primerů bylo v online programu OligoevaluatorTM (Sigma-Aldrich, USA) vyhodnoceno 25 nejlepších párů primerů, které se jevíly dle základních statistik nejlépe. V programu OligoevaluatorTM byly zjištěny fyzikální vlastnosti primerů (molekulová hmotnost, extinkční koeficient, obsah G a C bází, teplota tání), pravděpodobnost vzniku a sílu sekundárních struktur – vlásenek (hairpin) a dimerů. Z těchto návrhů bylo sekundárně vybráno pět finálních párů primerů (Tabulka II), které splňovaly nejlépe fyzikální a strukturní požadavky a byly použity k laboratornímu ověření.

4.2 Odběr vzorků

Vzorky byly získány ze soukromých chovů. Odběry vzorků proběhly vždy po šesti týdnech již od 6. týdne věku jedinců drůbeže až do doby 66. týdne věku. Tracheální výtěry byly provedeny odborně veterinářem za pomoci sterilních stěrových tamponů zn. COPAN, a ihned přepraveny do laboratoře, kde byly uskladněny v teplotě 4°C až do dalšího použití.

4.3 Izolace DNA

Izolace DNA byla zrealizována za pomoci laboratorního kitu PrestoTM Buccal Swab gDNA Extraction Kit (Geneaid) ze setřených tracheálních sliznic chovných nosnic. Směsný vzorek pro izolaci byl tvořen z celkem pěti odebraných stěrů, což umožnilo rychlejší screening populace drůbeže.

Před samotnou izolací byly připraveny roztoky pro Carrier RNA³ (přidáním 1,1 ml elučního pufru), promývací pufr (přidáním 100 ml 96% ethanolu – dále již jen jako WB), Proteinázu K (přidáním 1,1 ml ddH₂O) a pracovní roztok pufru S2 (smícháním 500 µl dodaného S2 pufru s 1 µl připraveného roztoku Carrier RNA do 1,5 µl zkumavky).

Ke směsným vzorkům bylo přidáno 500 µl dodaného pufru S1 (lyzační pufr) a 20 µl Proteinázy K, zvortexováno po dobu 10 sekund a vzorky byly inkubovány při teplotě 60°C po dobu 10 minut. Tento krok zajistil extrakci DNA z vatového tamponu do roztoku. Po uplynutí stanovené doby byly vatové tampony přemístěny do filtrační

³ dodán v kitu pro lepší efektivitu vazby DNA k membráně centrifugační kolonky.

kolonky, umístěné v 2 ml sběrné zkumavce. Tato zkumavka byla centrifugována 2 minuty při 16 000 x g. Centrifugace poskytla roztok s extrahovanou DNA a maximalizovala tak zisk gDNA. Do 1,5 µl zkumavky bylo přepipetováno 200 µl supernatantu z centrifugované 2 µl zkumavky a filtrační kolonka s vatovými tampony byla vyhozena. Následně bylo do 1,5 µl zkumavky napipetováno 500 µl předpřipraveného roztoku S2 a ihned zvortexováno. Vzorky byly inkubovány po dobu 10 minut při 60°C a každých 5 minut vortexováno.

Během inkubace byly připraveny GD kolonky a další sběrné zkumavky, eluční pufr byl předeřán na 60°C. Ke vzorkům po inkubaci bylo přidáno 500 µl 96% etanolu a vzorky byly přímo ve stojáncích protřepány. Následně byla směs (750 µl) přemístěna do GD kolonky a centrifugována 1 minutu při 16 000 x g, totéž bylo provedeno se zbylým lyzátem. Do nové sběrné zkumavky s GD kolonkou bylo přepipetováno 400 µl dodaného W1 pufru a centrifugováno 30 sekund při 16 000 x g. Dále byla sběrná zkumavka znovu použita a do ní přidáno 600 µl WB a centrifugováno 30 sekund při 16 000 x g. Sběrná zkumavka byla použita ještě jednou a centrifugována 3 minuty při 16 000 x g. GD kolonka byla přemístěna do nové 1,5 ml zkumavky a na její střed bylo přidáno 50 µl předeřátého elučního pufru. Vzorky byly následně inkubovány 3 minuty při laboratorní teplotě. Finálním krokem byla centrifugace při 16 000 x g po dobu 1 minuty, následně byly vzorky uchovány krátkodobě v chladu při teplotě 4°C. Při dlouhodobém uchování byly vzorky přemístěny do chladu o teplotě -18°C.

Tabulka I – Souhrn použitých sekvencí pro navržení primerů a jejich funkce v analýze.

Druh	Funkce v analýze	RefSeq	Druh	Funkce v analýze	RefSeq
MG	Master sekvence	GCF_000025365.1	MS	Necílová sekvence	GCF_000008245.1
	Pool sekvence	GCF_000025385.1		Necílová sekvence	GCF_000969765.1
	Pool sekvence	GCF_000092585.1		Necílová sekvence	GCF_002009055.1
	Pool sekvence	GCF_000211545.4		Necílová sekvence	GCF_003147565.1
	Pool sekvence	GCF_000286675.1		Necílová sekvence	GCF_003586085.1
	Pool sekvence	GCF_004771095.1		Necílová sekvence	GCF_009671165.1
	Pool sekvence	GCF_004771115.1		Necílová sekvence	GCF_013393745.1
	Pool sekvence	GCF_008728895.1		Necílová sekvence	GCF_019334145.1
	Pool sekvence	GCF_008728915.1		Necílová sekvence	GCF_020276565.1
	Pool sekvence	GCF_008728935.1		Necílová sekvence	GCF_020276585.1
	Pool sekvence	GCF_017654545.1		Necílová sekvence	GCF_020276625.1
	Pool sekvence	GCF_022349945.1		Necílová sekvence	GCF_020276645.1
	Pool sekvence	GCF_022349965.1		Necílová sekvence	GCF_022354765.1
	Pool sekvence	GCF_022349985.1		Necílová sekvence	GCF_026016765.1
	Pool sekvence	GCF_023523625.1		Necílová sekvence	GCF_026016825.1
	Pool sekvence	GCF_029814995.1		Necílová sekvence	GCF_026016845.1
	Pool sekvence	GCF_029815015.1		Necílová sekvence	GCF_026427675.1
	Pool sekvence	GCF_029815035.1		Necílová sekvence	GCF_026427695.1
	Pool sekvence	GCF_900476085.1		Necílová sekvence	GCF_900475235.1
Pool sekvence	GCF_000286715.1				

Tabulka II – Sekvence vybraných primerů na základě softwarové analýzy.

Název primeru	Délka produktu (bp)	Sekvence (5' - 3')
<i>169F</i>	169	GTCGTGCTAAAATAAGGCGC
<i>169R</i>	169	GGTGACTCTAGCTCCGTGTT
<i>171F</i>	171	TACGGAAACTAGGCCCTGT
<i>171R</i>	171	ACTATGACAAGGTGGTAGGGC
<i>188F</i>	188	ATTTGAAGATGATCCGCCGC
<i>188R</i>	188	CTGCTCCTTCTGCTGGTAGT
<i>199F</i>	199	GTGCGTGAAATCCTGGTGAA
<i>199R</i>	199	CCCAGT TACTTGAGCAACCA
<i>213F</i>	213	GTTGGGTACGATTGGGCTTG
<i>213R</i>	213	CCTGCTTGGTTTGGTGTCT

4.4 Optimalizace reakčních podmínek pro real time PCR

Optimalizace reakčních podmínek pro real time PCR byla z počátku rozdělena do několika kroků. První krok analýzy měl za cíl zhodnotit amplifikaci specifických produktů, předběžně určit specificitu k *MG* a navrhnout optimální počet cyklů PCR vzhledem k hodnotě C_t . Druhý krok byl zacílen na navržení teplotního optima pro nasedání primerů (annealing) za pomoci gradientové PCR a vizuálně-křížového ověření přes gelovou elektroforézu. Třetím, a také posledním, krokem bylo použití optimalizovaných podmínek pro různé typy vzorků a finální určení druhové specificity.

Prvním krokem analýzy bylo provedení real time PCR (QS6 Flex System, Life technologies) směsných vzorků s navrženými primery a za použití SYBR[®]GREEN jako vizualizačního činidla. Každý vzorek byl předem testován na přítomnost mykoplazem (*MG*, *MS*) pomocí kitu Kylt[®] MGS Triplex Real Time (AnIcon, Germany), aby bylo možné stanovit, zda a jaké mykoplazmární druhy se ve směsném vzorku nachází, a tedy použití navržených primerů dává spolehlivé výsledky. Reakční objem každého vzorku byl stanoven na 10 μ l, přičemž objemy reakčních komponentů byly v poměru: 5 μ l master mixu (SYBR[®]GREEN, Thermo Fisher Scientific), 1 μ l 100x ředěného F-primeru, 1 μ l 100x ředěného R-primeru⁴, 2 μ l PCR H₂O (Top-Bio), 1 μ l DNA vzorku. Počet cyklů real time PCR byl stanoven na 50. Samotná reakce real time PCR sestávala z několika postupně jdoucích kroků, zohledňujících teplotu a délku trvání cyklu (Tabulka III). Výsledkem byla křivka tání a křivka amplifikace (kapitola Výsledky).

Tabulka III – Reakční schéma real time PCR.

Druh fáze	Úroveň	Teplota (°C)	Doba trvání (min:s)	Záznam dat	Počet cyklů (opakování)
Stabilizační	1	50	2:00	-	-
	2	95	10:00	-	
PCR	1	95	0:15	-	50 x
	2	60	1:00	ANO	
Křivka tání	1	95	0:15	-	-
	2	60	1:00	ANO	
	3	95	0:15	-	

⁴ ředění zásobního roztoku primerů 100x dle návodu od dodavatele

Druhý krok analýzy zahrnoval provedení gradientové PCR s vybranými primery, které se jeví na předchozích výsledcích křivek nejlépe. Průběh PCR byl realizován v termocyleru (Biometra T advanced 96 G) s reakčním programem cycleru o šesti krocích, podobně jako bylo popsáno výše pro real time PCR, avšak v kroku annealingu bylo nastaveno teplotní rozmezí od 55,2 - 61,8°C. Reakční objem byl navýšen na 20 µl, přičemž poměry použitých chemikálií byly nastaveny na 10 µl MM (Top-Bio), 0,8 µl 100x zředěného F primeru, 0,8 µl 100x zředěného R primeru, 7,4 µl PCR H₂O (Top-Bio) a 1 µl DNA. Počet cyklů stanoven na 40. Pro vizualizaci byla zvolena gelová elektroforéza (zdroj napětí – EnduroTM 300 V, Labnet International Inc.), při celkovém napětí 80 V, po dobu 40 min s použitím 2% agarózového gelu a jako vizualizační činidlo byl použit ethidium bromid (Sigma Aldrich – E1510).

Třetí krok analýzy zahrnoval kompletní porovnání wt *MG*, wt *MS*, vakcíny *MS-H*, směsi wt *MS* a vakcíny *MS-H*, čisté kultury *MP* a směsného vzorku *MP* nejen v termocyleru ve spojení s gelovou elektroforézou i v real time cycleru. Reakční podmínky byly nastaveny podle předem vypočtené teploty pro nasedání primerů (Tabulka IV).

Tabulka IV – Optimalizované podmínky PCR pro primery.

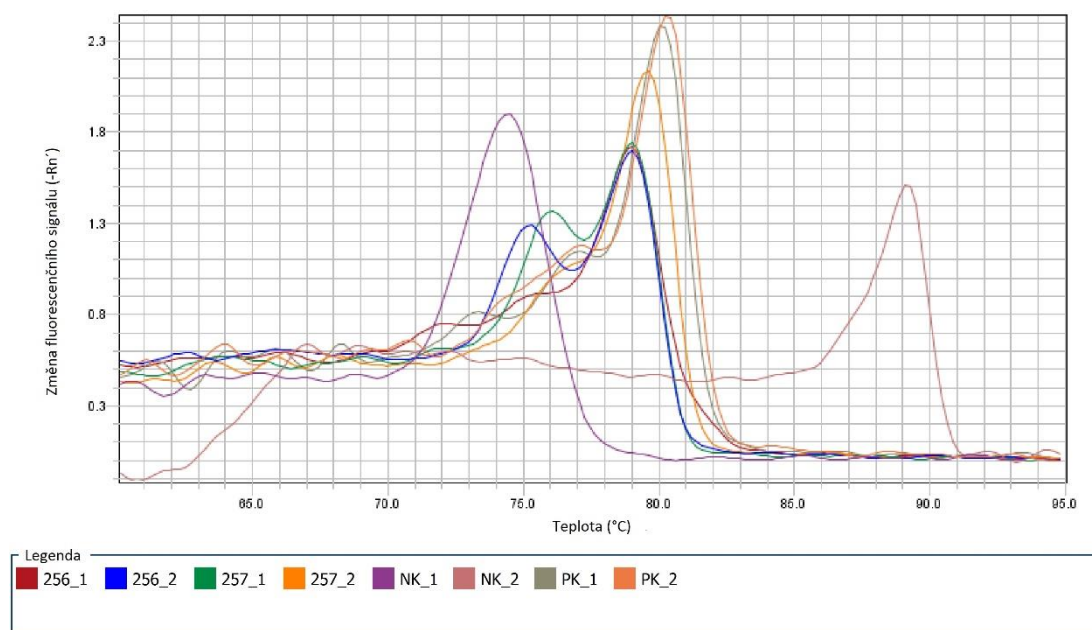
Krok (fáze)	Teplota (°C)	Délka cyklu (s)	Počet cyklů (opakování)
Úvodní denaturace	95	300	-
Denaturace	95	30	40
Nasedání primerů	61	30	
Extenze vlákna	72	30	
Finální extenze	72	300	-
Konzervace	4	(nelimitováno)	-

5 Výsledky

5.1 Úvodní test primerové specificity

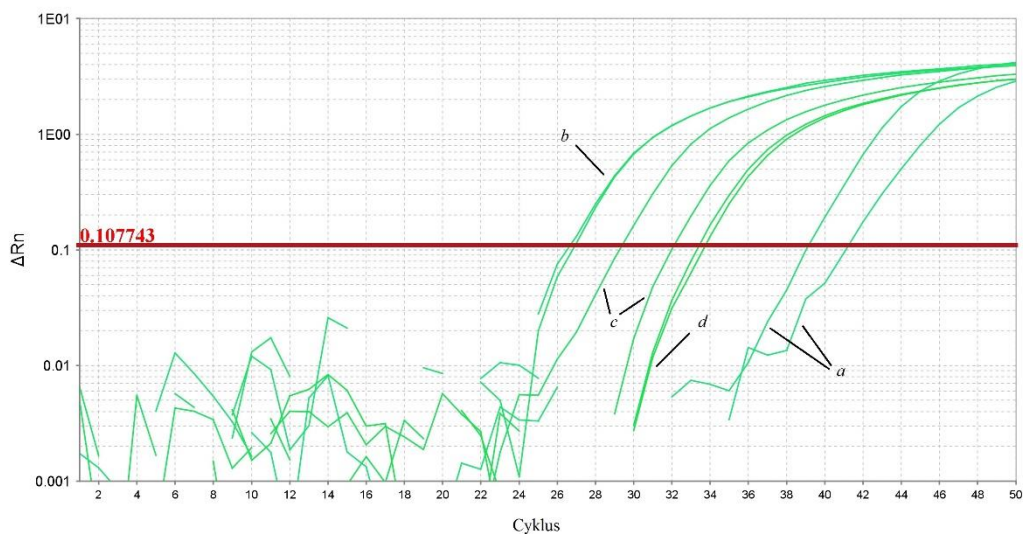
V následujících přiložených grafech byla zhodnocena specificita navržených primerů. Jako vhodné primery pro detekci se předběžně jevily *213F/R* a *171F/R*. Ostatní primery (*169F/R*, *188F/R*, *199F/R*) navzdory své softwarové robustnosti, nebyly po praktické laboratorní analýze dostatečně vhodné pro detekci.

Všech pět párů navržených primerů bylo testováno pomocí real time PCR v reakčním objemu 10 μ l. Pro primery *169F/R*, *171F/R*, *188F/R*, *199F/R*, a *213F/R* bylo použito 50 cyklů. Každý z použitých vzorků byl testován ve dvojnásobném opakování, aby předběžná specificita primerů byla prokazatelná. Vzorek 256 byl předem stanoven jako negativní na obsah *MG*, vzorek 257 jako pozitivní na obsah *MG*, vzorek 264 jako byl přidán jako pozitivní kontrolní vzorek a PCR voda byla použita jako negativní vzorek. Z hlediska spolehlivosti metody byla porovnávána nejen křivka tání, ale též křivka amplifikace.



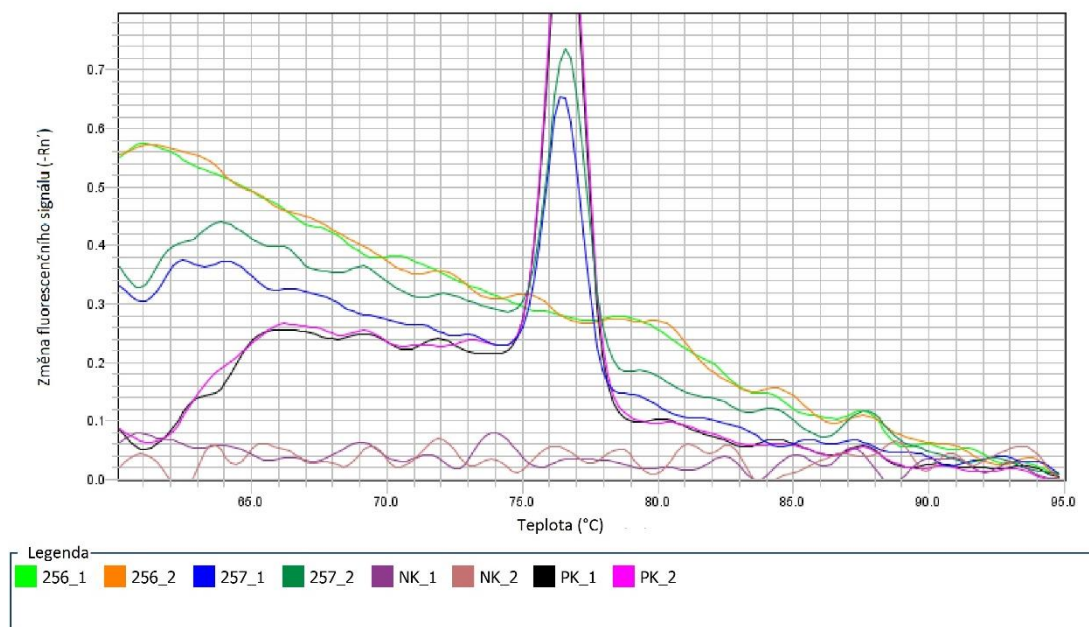
Graf 1 - Křivky tání primerů *213F/R*.

Z grafu (Graf 1) lze vyčíst, že u negativních kontrolních vzorků (NK_1 a NK_2) měly křivky tání největší tendenci změnit fluorescenční signál při teplotách 74,4°C a 89,2°C. U ostatních vzorků tato tendence se pohybovala v rozmezí 79 - 91,2°C.



Graf. 2 - Křivky amplifikace vzorků při použití primerů 213F/R.

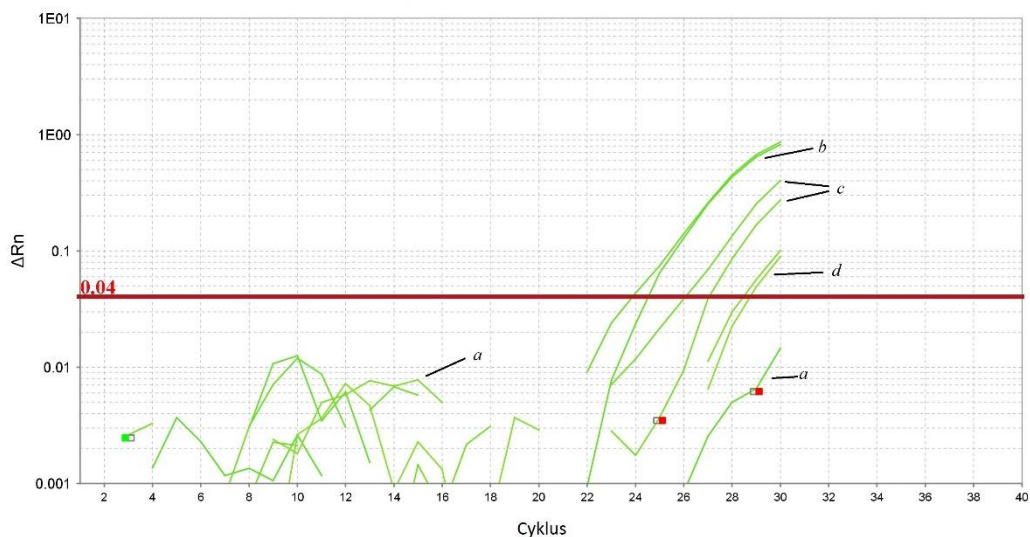
Graf (Graf 2) amplifikace vzorků pomáhá objasnit nejasnosti z prvního grafu (Graf 1), který také odpovídá primerům 213F/R. Dvojkřivka *b* poukazuje na amplifikace vzorku pozitivní kontroly s podobnými hodnotami C_t ($C_t = 26,670$ a $C_t = 26,894$). Křivky *c* vyjadřují amplifikaci vzorků 257 s hodnotami $C_t = 29,399$ a $C_t = 32,091$. Dvojkřivka *d* naznačuje průběh amplifikace u vzorku 256 ($C_t = 33,394$ a $C_t = 33,713$). Negativní kontrolní vzorek označený dvojkřivkami *a* odkazoval na nejvyšší hodnoty C_t vzhledem k ostatním použitým vzorkům ($C_t = 39,229$ a $C_t = 41,197$).



Graf 3 - Křivky tání primerů 171F/R.

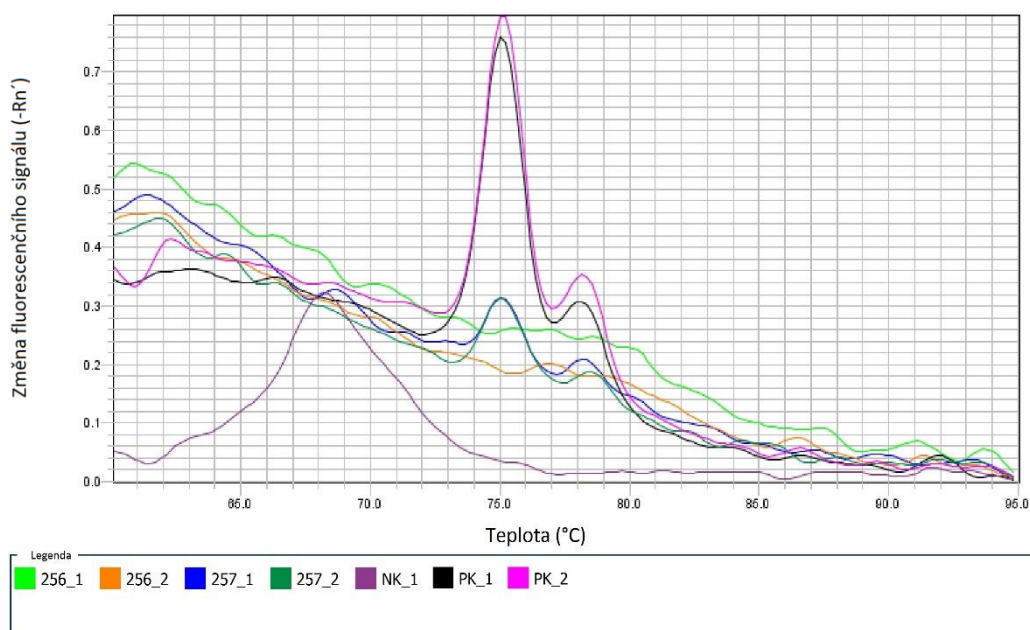
Z grafu (Graf 3) je patrné, že DNA pozitivních vzorků, tj. 257 a PK v opakování mělo stejnou tendenci měnit fluorescenční signál při teplotě 76,5°C. U negativních vzorků

256 se změnil fluorescenční signál v nepřímé úměrnosti s rostoucí teplotou a negativní kontrolní vzorky NK_1, NK_2 neměly signál vůbec.



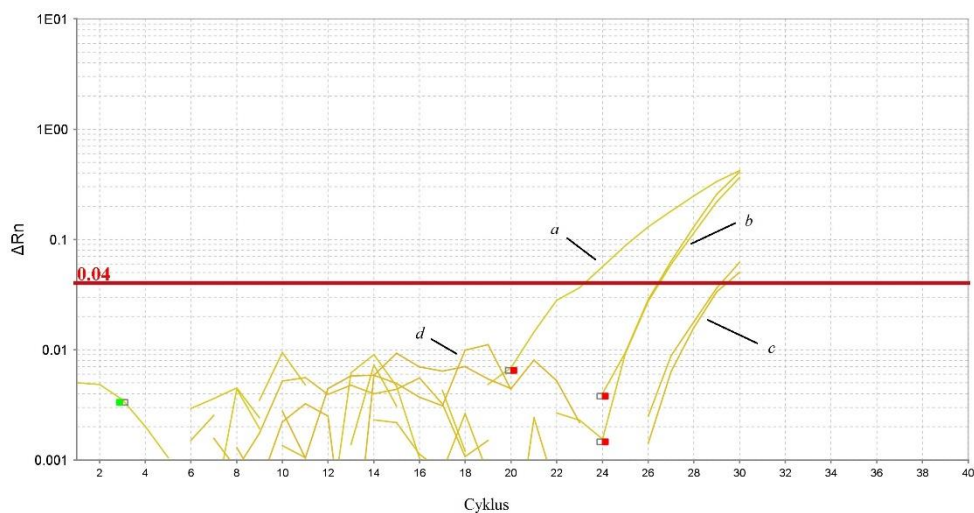
Graf 4 - Křivky amplifikace vzorků při použití primerů 171F/R.

Z grafu (Graf 4) je patrné, že hodnota C_t u stejného druhu vzorků se liší jen minimálně. Křivka *a* odkazuje na negativní kontrolní vzorek, u něhož nebyl zaznamenán specifický fluorescenční signál. Dvojkřivka *b* odkazuje na pozitivní kontrolní vzorek (264) s hodnotami C_t 23,924 a 24,538. Dvojkřivka *c* prokazuje hodnoty C_t 26,215 a 27,054 u vzorku 257 a dvojkřivka *d* odkazuje na vzorek 256 s hodnotami C_t 28,382 a 28,657.



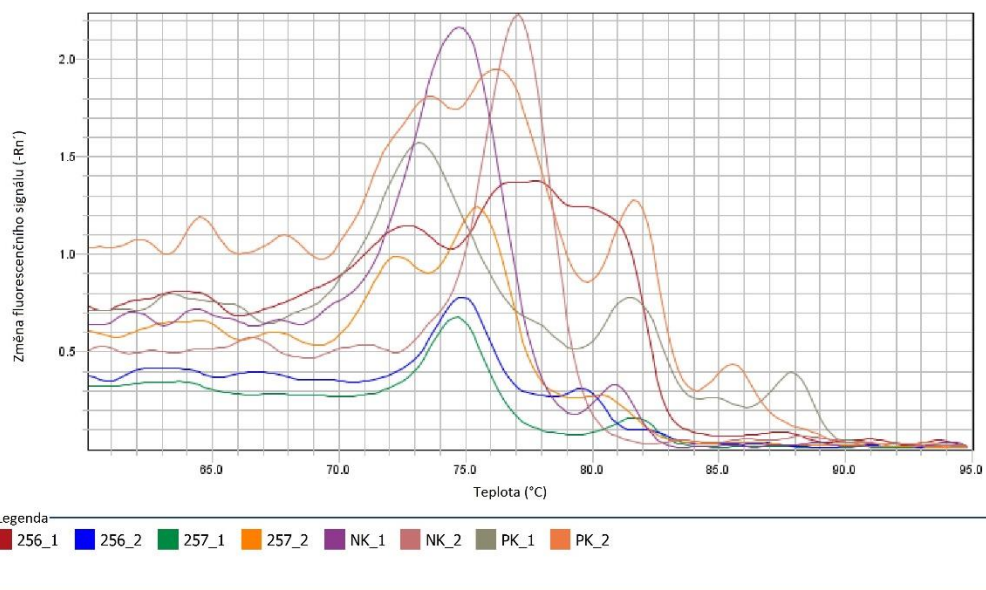
Graf 5 - Křivky tání primerů 169F/R.

Z grafu (Graf 5) lze vyvodit, že DNA pozitivních vzorků, tj. 257 (vzorky v opakování s označením 257_1 a 257_2) a PK (taktéž v opakování) má stejnou tendenci měnit fluorescenční signál při teplotě 75°C. Naopak negativní vzorky 256 (256_1 a 256_2) nemění signál vůbec. U NK_1 je zřejmá změna fluorescenčního signálu okolo 68°C, která může znamenat nespecifickou tvorbu dimerů, případně jiného produktu.



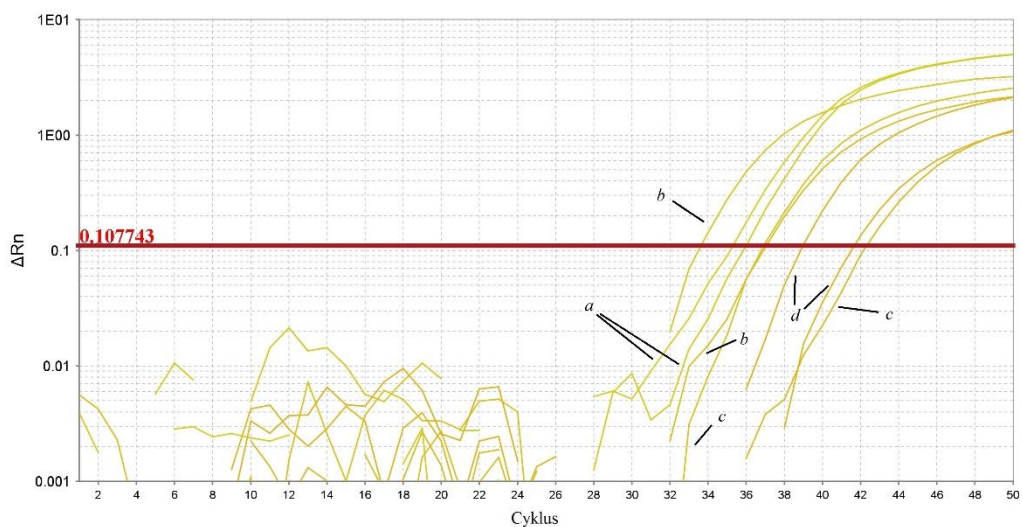
Graf 6 - Křivky amplifikace vzorků při použití primerů 169F/R.

Z grafu (Graf 6) vyplývá, amplifikace různých vzorků je závislá především na koncentraci cílové DNA ve vzorku. Křivka *a* znázorňuje negativní kontrolní vzorek reakce, jehož hodnota C_t byla 23,929 a pro tyto vzorky byla nejnižší. Dvojitá křivka *b* odkazuje na pozitivní kontrolní vzorek (264_1 i 264_2), jehož hodnota C_t byla 26,556, zatímco dvojitá křivka *c* poukazuje na vzorek 257, jehož hodnota C_t ležela na počátku 29. cyklu a poukazuje na amplifikaci v pozdější fázi reakce. U vzorku 256 (křivka *d*) nebyla patrná žádná amplifikace, pouze nespecifické fluorescenční signály.



Graf 7 - Křivky tání pramenů 188F/R.

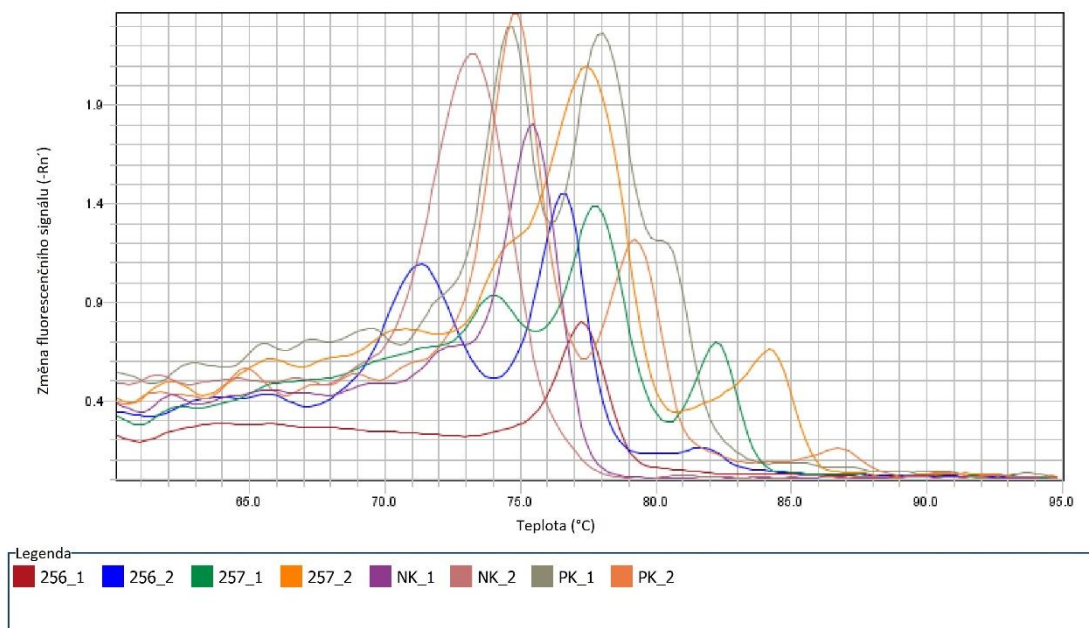
Z grafu (Graf 7) je patrné, že u vzorků dochází k tvorbě nespecifických produktů, které z podstaty věci nejsou pro detekci vhodné.



Graf 8 - Křivky amplifikace vzorků při použití pramenů 188F/R.

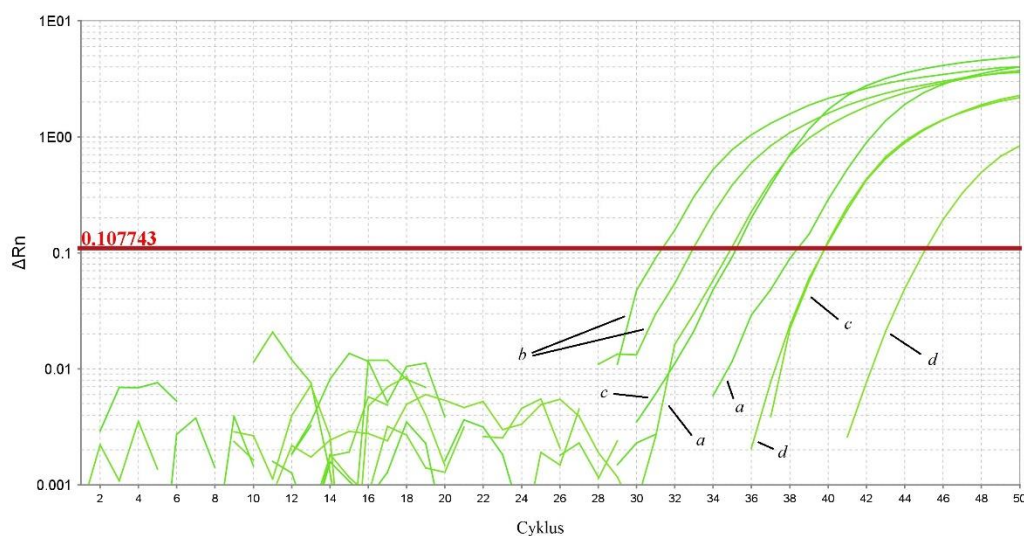
Graf (Graf 8) poukazuje na skutečnost, že při reakci dochází k tvorbě nespecifických produktů. Pro křivky *b*, znázorňující pozitivní kontrolní vzorky byly stanoveny hodnoty C_t 33,602 a 36,983. Dvojčivka *a*, značící negativní kontrolní vzorky, vykázala podobný průběh reakce s hodnotami C_t 35,274 a 35,937. První varianta vzorku 257 (křivka *c*) vykazovala podobný průběh amplifikace jako jedna z křivek *b* a hodnota C_t

($C_t = 36,909$) se liší nepatrně, naopak druhá varianta vykazala hodnotu C_t ($C_t = 42,271$) až v pozdějším cyklu reakce. Hodnota C_t u vzorků 256 (křivky *d*) byla 38,950 a 41,591.



Graf 9 - Křivky tání pramerů 199F/R.

Z grafu (Graf 9) je zřejmé, že při použití pramerů 199F/R proběhla změna fluorescenčních signálů podobně jako u pramerů 188F/R, tj. nespecifiicky a lze tedy vzít předběžně v úvahu, že tento pár pramerů není vhodný pro detekci MG.



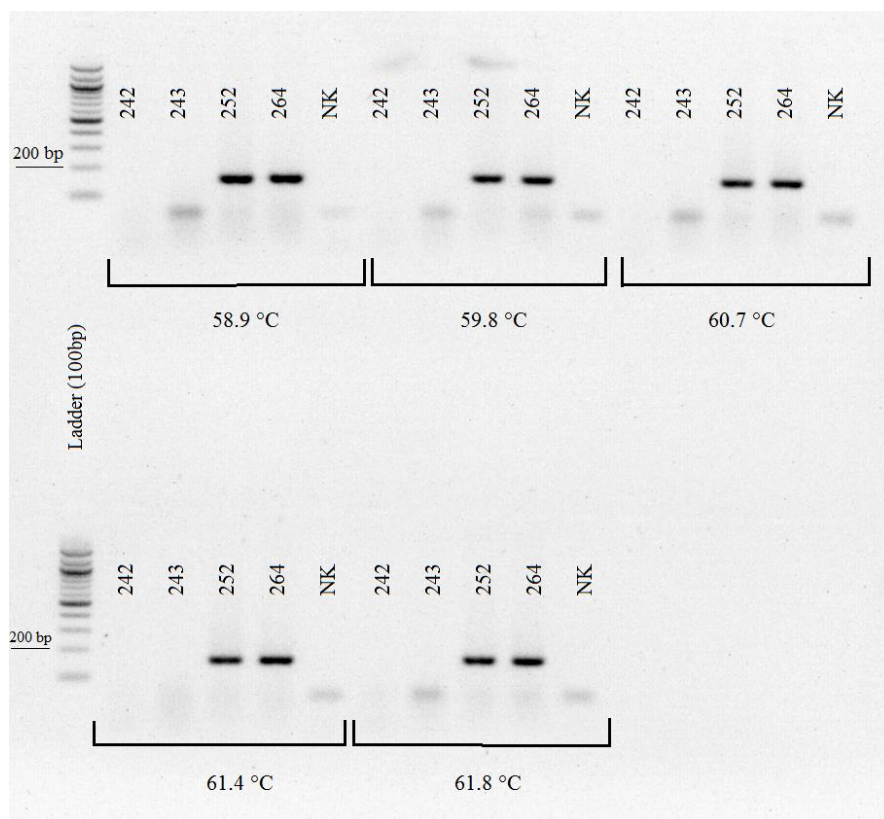
Graf.10 - Křivky amplifikace vzorků při použití pramerů 199F/R.

Z grafu (Graf 10) je patrné, že pozitivní kontrolní vzorek (křivka *b*) měl nejnižší hodnoty C_t , tj. 31,374 a 32,934. Jedna varianta negativního vzorku (křivka *a*) a jedna varianta vzorku 257 (křivka *c*) měly podobný průběh amplifikace a jejich hodnoty C_t se

téměř neodlišovaly ($C_t = 34,927$ a $35,214$). Druhá varianta vzorku 257 (křivka *c*; hodnota $C_t = 39,833$) se překrývala s první variantou vzorku 256 (křivka *d*; $C_t = 39,770$). Druhé varianty negativního kontrolního vzorku ($C_t = 38,500$) a vzorku 256 ($C_t = 45,040$) neodpovídaly vzorkům stejného druhu.

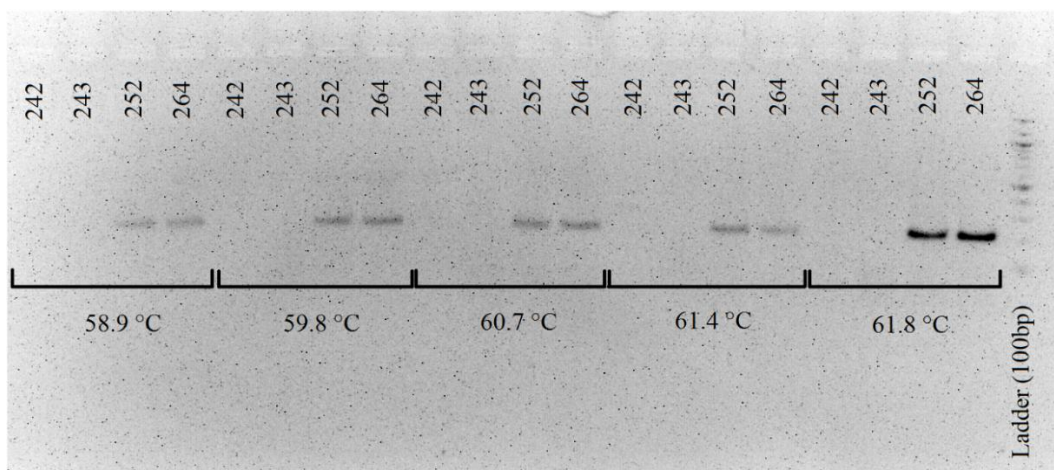
5.2 Gradientová PCR

Provedení gradientové PCR mělo stanovit nejlepší teplotu pro nasedání vybraných primerů. Pro tuto analýzu byly vybrány primery *171F/R* a *213F/R* vzhledem k přívětivě vypadajícím výsledkům analýz na real time cycleru. Gradientová PCR byla provedena na jiných vzorcích než v případě real time PCR, vyjma vzorku 264 - který byl testován již v předchozí analýze, z důvodu ověření specificity a rozšíření portfolia testovaných vzorků. Nově použité vzorky byly označeny jako: 242, 243, 252, kde: 242 a 243 představoval vzorek s nepřítomností *MG*, 252 a 264 představoval vzorek s přítomností *MG*. Teplotní rozmezí bylo v případě obou primerů nastaveno od $55,2^\circ\text{C}$ do $61,8^\circ\text{C}$, přičemž větší důraz byl kladen na teplotní zónu mezi $58,9 - 61,8^\circ\text{C}$ (vzhledem k softwarové analýze).



Obr. č.2 - Výsledek gelové elektroforézy při použití primeru *171F/R* v teplotním rozmezí $58,9-61,8^\circ\text{C}$ [zdroj: autor].

Z obrázku (Obr. č.2) je zřejmé, že teplotní rozmezí 58,9°C až 61,8°C se ukazuje jako robustní a lze při těchto teplotách realizovat detekci *MG*. Zároveň je patrná i specifická primérů *171F/R* ke zkoumaným vzorkům. Širší velikost proužků, znázorňující syntetizované produkty, odpovídá vyšší míře použitých cyklů při PCR.



Obr. č.3 - Výsledek gelové elektroforézy při použití primeru *213F/R* v teplotním rozmezí 58,9-61,8°C [zdroj: autor].

Obrázek (Obr. č.3) prokazuje, že teplotní rozmezí mezi 58,9°C až 61,8 °C je optimální pro použití detekčních metod k přítomnosti *MG* ve vzorcích. Je též patrné, že primery *213F/R* jsou specifické. Širší velikost proužků, znázorněné při teplotě 61,8°C u vzorků 252 a 264 vůči ostatním, lze vysvětlit použitím vyšší vstupní koncentrace DNA do reakce, nežli je tomu u ostatních vzorků.

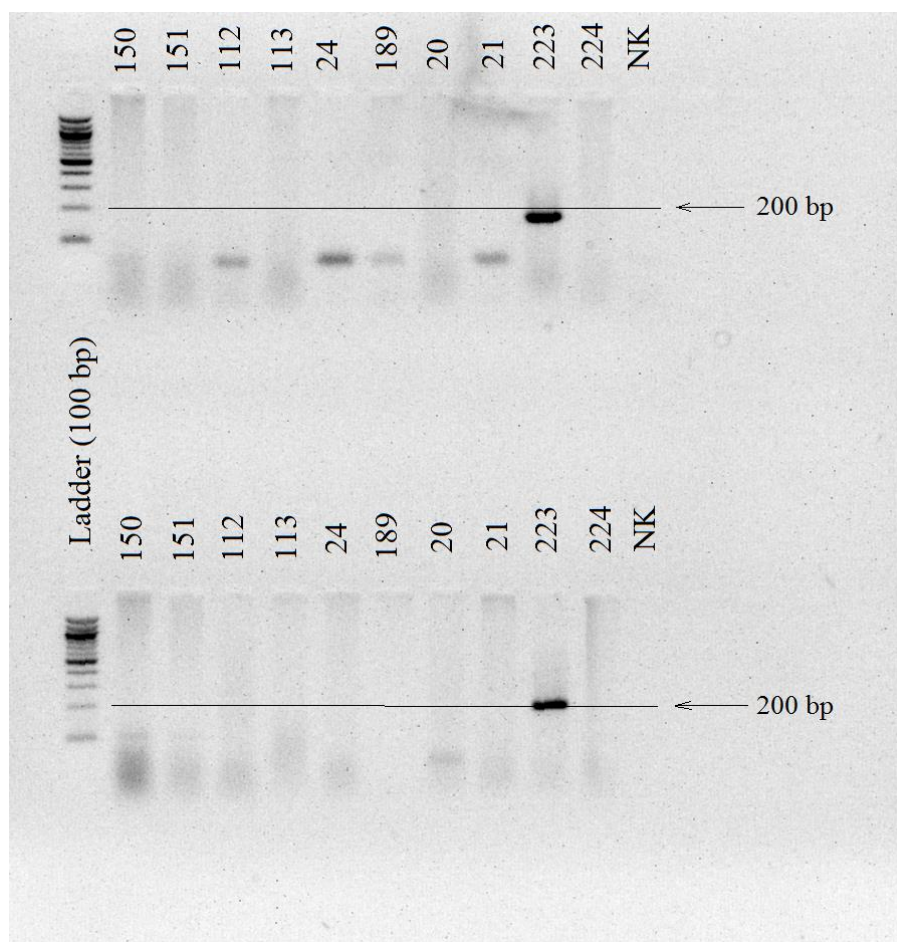
5.3 Testování druhové specifity vybraných primerů

Testování specifity primerů *171F/R* a *213F/R* proběhlo při optimalizované teplotě nasedání primerů (61°C), ostatní kroky PCR byly nezměněny. Specifita primerů byla testována na osmnácti vzorcích, které se lišily svou povahou. Následující tabulka (Tabulka V) shrnuje označení a variaci vzorků.

Tabulka V – Souhrn použitých vzorků pro stanovení druhové specifity.

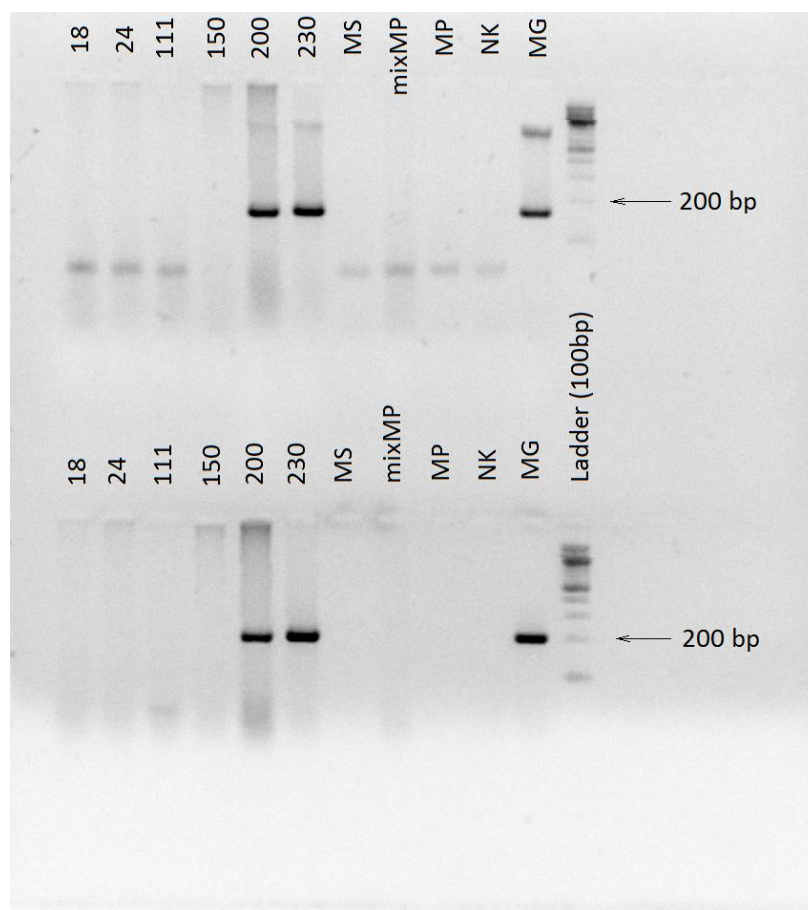
Laboratorní číslo vzorku	Výsledek testu MGS-Triplex
18, 20, 21	wt <i>MS</i> + vakcína <i>MS-H</i>
24, 189	pozitivní na wt <i>MS</i>
111, 112, 113	pozitivní na vakcínu <i>MS-H</i>
150, 151	negativní na wt <i>MG</i>
200, 223, 224, 230	pozitivní na wt <i>MG</i>
mixMP	pozitivní na wt <i>MP</i>
MP	syntetická pozit. kontrola <i>MP</i>
MS	syntetická pozit. kontrola <i>MS</i>
MG	syntetická pozit. kontrola <i>MG</i>

Vzorky byly vybrány k analýze specifity podle toho, zda vykazovaly po stanovení za použití kitu signál pozitivní pro *MG*. Vzorek bukálního stěru myši (zde označený jako mixMP) byl poskytnut jako doplňkový sbírkový vzorek.



Obr.č.4 - Gelová elektroforéza I vybraných vzorků při použití primerů 171F/R (nahore) a 213F/R (dole)[zdroj:autor].

Z obrázku (Obr.č.4) je zřejmé, že optimalizované podmínky pro oba páry primerů fungují v detekci dostatečně a je s nimi možné detekovat *MG* přímo i ve směsných vzorcích. Druh *MS* nebyl za použití této optimalizované metody detekován – a to ani ve vzorcích vyskytující se společně s vakcínou MS-H. U vzorku 224, který představoval jeden ze vzorků pozitivních na *MG* nebyl zachycen na elektroforetickém gelu žádný signál ve formě proužku. Po srovnání výsledků u vzorku 224 na real time PCR cycleru s výsledkem gelové elektroforézy bylo zjištěno, že hodnota C_t byla zaznamenána v 38. cyklu reakce (jako výsledek z kitu Kylt[®] MGS Triplex). Vzhledem k této skutečnosti je nepravděpodobné, že by množství nově syntetizované DNA v reakci se 40 cykly bylo patrné na gelu.

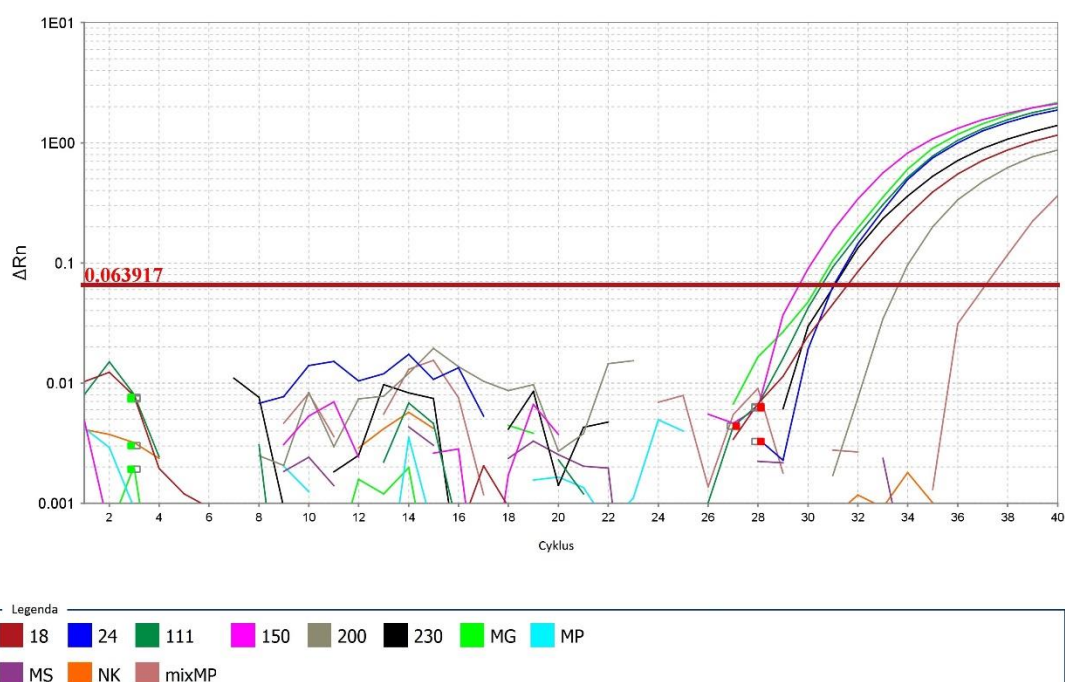


Obr.č.5 - Gelová elektroforéza II vybraných vzorků při použití primerů 171F/R (nahore) a 213F/R (dole) [zdroj:autor].

Z obrázku (Obr.č.5) vyplývá, že navržené detekční primery identifikují spolehlivě druh *MG* v použitých vzorcích i v syntetické pozitivní kontrole *MG*. Ostatní použité vzorky nejeví známky amplifikace cílových úseků, a tedy je možno předpokládat, že

jsou primery dostatečně specifické. U primerů *171F/R* si lze povšimnout nespecifického produktu o délce přibližně 800 bp, avšak pouze u vzorků *MG*. Vzhledem k použití a citlivosti real time cycleru, se kterým bylo elektroforetické stanovení do metodiky spojeno, byl na tento fragment brát zřetel a bude předmětem dalšího zkoumání. Jediným fragmentem, který je dostatečně specifický, byl fragment o délce 213 nukleotidů při použití primeru *213F/R*.

Na konec bylo provedeno stanovení PCR na real time cycleru, aby elektroforetické stanovení bylo podloženo citlivější metodou (Graf 11).



Graf 11 - Křivky amplifikace vzorků při použití primerů *213F/R*.

Křivky amplifikace (Graf 11) vykazují hodnoty C_t v intervalu 29. až 38. cyklu. Pro kontrolní vzorky odlišných syntetických mykoplazmárních druhů, tj. *MS*, *MP* a negativní kontrolní vzorek nebyla stanovena hodnota C_t vzhledem k amplifikaci. U vzorku 200, který vykazoval pozitivitu na přítomnost *MG*, je nárůst křivky zaznamenán až v pozdější fázi cyklů, kvůli nižší koncentraci DNA ve vzorku.

Nejllepšími navrženými oligonukleotidy, pro detekci druhu *MG*, byly stanoveny primery *213F/R*. Tyto primery dostatečně prokázaly specifitu k druhu *MG* a jsou tedy vhodnými markery pro diagnostiku této bakterie.

6 Diskuse

Mycoplasma gallisepticum patří k důležitým drůbežím patogenům, které ovlivňují zdravotní a ekonomickou stránku hospodářského chovu. Existence vakcín a přísná biosecurity mohou problém s tímto patogenním organismem dočasně vyřešit, je však nutné tato opatření pečlivě dodržovat. Vzhledem ke zvýšenému používání vakcín je podobnost vakcinačních kmenů s divokými znatelná a rozdíly naopak minimální. Je tedy vhodné nalézt optimální molekulárně detekční metodu, která dokáže odlišit tyto dvě mykoplazmární varianty mezi sebou.

Tato práce se zaměřuje na návrh detekčních mechanismů a jejich laboratorní ověření z celogenomových dat cílového organismu *Mycoplasma gallisepticum*. V porovnání s ostatními studii se tato práce primárně nezaměřuje na konkrétní známé detekční geny, ale pracuje se softwarově navrženými sekvencemi, které jsou pro druh *MG* unikátní. Některé z těchto sekvencí odkazují na místa, která jsou funkčně známa, avšak se k detekci nevyužívají.

Mnohé studie (Bekö a kol., 2019; Marouf a kol. 2020, 2022; Mattuci a kol., 2023) se shodují, že nejlepší pro detekci druhu *MG* je gen *mgc2* v kombinaci s detekcí intergenických oblastí pro *16S-23S rRNA*. Vzhledem k této skutečnosti je doporučováno WOH použít tyto úseky jako detekční. Ve studii (Gróznér a kol., 2019) bylo zjištěno, že mykoplazmární druhy se v genu pro *16S rRNA* liší jen velmi málo (0,9-9,5 %). Z tohoto důvodu nelze usuzovat, že je detekce *16S rRNA* dostatečná a měla by být doplněna o další detekční mechanismus, který potvrdí druhovou specificitu. Ghanem a kol. (2019), Sulyok a kol. (2019), Kang a kol. (2023), Mattuci a kol. (2023), Wei a kol. (2023) navrhuji použít metodu MLST pro detekci kombinace genů *dnaA*, *fusA*, *rpoB*, *gapA*, *lpd*, *plpA*, *parE*, *potC*, *glpK*, *hlp2*, *uvrA*. Většina z těchto genů zajišťuje tvorbu přenosných proteinů pro jiné proteinové struktury, transportované k místu replikace. Jiné jsou samy součástí proteinově – komplexních faktorů zajišťující replikaci a zbývající fungují jako součást adhezních lipoproteinových struktur na povrchu cytoplasmatické membrány. Vzhledem k rychlému evolučnímu vývoji, kterému mykoplazmární druhy podléhají, lze očekávat, četné polymorfismy v těchto úsecích. Náhled do těchto změn by mohla přinést MAMA analýza (Sulyok a kol., 2019), která je kombinovatelná s real time PCR platformami anebo konvenční PCR spojenou s gelovou elektroforézou. Důležité je detekovat specifické *housekeeping* úseky, které podléhají

možným mutačním tlakům méně, aby metoda detekce mohla být spolehlivá a snadno reprodukovatelná.

Navržené unikátní sekvence byly získány analýzou genomů prostřednictvím programu KEC. Tento program rozšiřuje možnosti získání bioinformatických dat uživateli, kteří byli doposud zvyklí na používání základních nástrojů systému Linux. Oddělené trimování, assembly, alignment nebo filtrování je nahrazeno v podstatě dvěma základními příkazy (include/exclude), které dokážou spolehlivě poskytnout data v nízkém časovém horizontu i uživatelům platform Mac a Windows bez předchozích pokročilých znalostí práce s bioinformatickými daty (Beran a kol., 2021). Ačkoliv některým základním úkonům, jako je např. filtrování dat, se nelze vyhnout, poskytuje tento program široké využití pro prokaryotické i eukaryotické genomy.

Mnou získané unikátní sekvence byly filtrovány na takové, které jsou delší než 5000 nukleotidů. Záměrem bylo, aby návrh detekčních primerů mohl pracovat s co nejdelšími unikátními úseky a množství navržených primerů se tímto mohlo zvýšit. Délka (do 200 bp) amplifikovaného úseku těmito primery byla přizpůsobena možností real time cycleru, aby mohla být efektivita detekce prokazatelná (LabGuide, 2020). Jeden z párů primerů byl záměrně zvolen, aby amplifikoval oblast delší než 200 párů bází, tj. 213 bází a prokázaly se tak možnosti využití a senzitivita real time cycleru. Tento pár primerů amplifikoval část lokusu pod označením HFMG94VAA. Lokus v sobě zahrnuje sekvenci genu pro transportní membránový protein permeázu, který je nutný pro řízení osmotického tlaku a transportu živin do buňky. Tato sekvence se objevuje ve studii Tulman a kol. (2012), kde však není zaevidovaná jako detekční marker pro druh *MG*. Spojením studie a této diplomové práce však vyplývá závěr, že je úsek dostatečně druhově specifický, aby byl začleněn pro přímou detekci *MG* pomocí konvenční nebo real time PCR.

Jako druhý slibný detekční pár primerů se jeví primery s označením *171F/R*, amplifikující lokus s označením MGAH_RS00230, uprostřed genu pro thymidylát syntázu. Thymidylát syntáza je enzym zodpovědný za přeměnu nukleové báze deoxyuridinátu na thymidilát a je důležitým faktorem pro replikaci DNA (Allison a Lambert, 2024). Rozdílem oproti 213F/R, byla navzdory stejným optimalizovaným podmínkám detekce skutečnost, že tento pár primerů při vizualizaci na gelové elektroforéze prokázal amplifikaci cílového produktu nejen na délce 171 bází, ale též na úrovni velikosti 800 bází. Tato skutečnost byla pozorována pouze ve vzorcích obsahující druh *MG*. Je tedy možné, že použití tohoto detekčního primeru bude mít své místo v budoucích

stanoveních, avšak z této práce bylo vyčleněno, vzhledem k nejasnostem ohledně charakteru produktu.

Na stejný lokus jako u *171F/R* primerů, s rozdílným počátečním nukleotidem a délkou amplifikovaného fragmentu (199 párů bází), nasedal pár primerů s označením *199F/R*. Laboratorně bylo potvrzeno, že navzdory softwarovému návrhu, se v reakci amplifikuje tento úsek i ve vzorcích, kde *MG* nebyla potvrzena. Z tohoto důvodu se páru primerů nevěnovala pozornost a byl z laboratorní analýzy vyčleněn.

Detekční mechanismy pro mykoplazmární druhy se nemusí opírat pouze o transportní proteiny, ale i proteiny začleněné např. do provizorní prokaryotické imunitní odpovědi. Jako jednu z možností lze zvážit použití CRISPR-Cas systémů, které prokaryota využívají jako defenzivní mechanismus pro fágovou invazi (Jackson a kol., 2017). Zajímavým faktem je, že kvůli unikátní genetické stavbě CRISPR-Cas systémů, konkrétně zde genu *cas9*, kterou zmiňuje Zhou a kol. (2021) napříč mykoplazmárními druhy, byla i pro druh *MG* v této práci navržena unikátní sekvence pro primerový konstrukt k detekci tohoto genu. Metodu pro amplifikaci úseku o délce 169 bází se však nepodařilo laboratorně optimalizovat a diference mezi geny *cas9* zůstává tak prozatím skryta.

Jako poslední detekční pár primerů je předložen *188F/R*. Tento konstrukt byl navržen na oblast pod označením WP_011113790.1, která doposud nemá přiřazenou funkci a předpokládá se na základě CheckM analýzy genomu, že je v tomto úseku hypotetický protein. Laboratorní analýza nepotvrdila specifčnost vzhledem k softwarové analýze, protože k amplifikaci úseku o délce 188 párů bází došlo nejen u pozitivních, ale též negativních vzorků obsahující *MG*.

7 Závěr

Z předložené diplomové práce na téma „Molekulární detekce druhu *Mycoplasma gallisepticum* na základě celogenomových dat“ vyplývají tyto závěry:

- Pro návrh detekčních primerů byly softwarově nalezeny a laboratorně využity unikátní části cílových genomů *MG*.
- Laboratorní optimalizace stanovila: 61°C jako teplotu vhodnou pro annealing páru primerů *171F/R* a *213F/R* a optimální počet PCR cyklů pro
 - a) Real time PCR na hodnotu 50 v celkovém objemu reakce 10 µl
 - b) End point PCR na hodnotu 40 v celkovém objemu reakce 20 µl.
- Amplifikace DNA u druhu *Mycoplasma synoviae* a její vakcíny MS-H a druhu *Mycoplasma pulmonis* a jejího směsného vzorku při použití primerů *171F/R* a *213F/R* nebyla prokázána.
- Specifická navrženého páru primerů *213F/R* byla softwarově i laboratorně prokázána v testovaných vzorcích pozitivních na výskyt druhu *Mycoplasma gallisepticum*, na rozdíl od páru primerů *171F/R*, který amplifikoval v reakci jeden specifický produkt (171 bp) a jeden nespecifický produkt (800 bp).
- Nejlépe na cílové sekvence nasedaly primery *213F/R*.

Seznam použité literatury

ABDELRAHMAN, A. A., S. A. S. SAHNY, K. E. HASSAN, A. DARDEER a M. F. EL-KADY, 2021. Avian *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*: Advances in diagnosis and control. *German Journal of Veterinary Research* [online]. **2021**(2), 46-55 [cit. 2023-08-16]. Dostupné z: <https://gmipc-akademie.de/articles/gjvr/single/43>

ALLEN, C. R., A. MARA, E. R. TULMAN, D. H. LEY a S. J. GEARY, 2018. House finch (*Haemorhous mexicanus*)– associated *Mycoplasma gallisepticum* identified in lesser goldfinch (*Spinus psaltria*) and western scrub jay (*Aphelocoma californica*) using strain specific quantitative PCR. *Journal of Wildlife Diseases* [online]. 2018-1-1, **54**(1) [cit. 2023-07-12]. ISSN 0090-3558. Dostupné z: doi:10.7589/2017-04-079

ALLISON, D. G. a P.A. LAMBERT, 2024. Modes of action of antibacterial agents. *Molecular medical microbiology* [online]. 2024(3), 597-614 [cit. 2024-04-10]. Dostupné z: doi:doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00133-7

ALMS, D. M., M. M. LANGAGER, CH. L. WEITZMAN a D. M. HAWLEY, 2023. Effects of *Mycoplasma gallisepticum* infection on preening behaviors and feather quality in house finches (*Haemorhous mexicanus*). *Journal of Wildlife Diseases* [online]. 2023-4-1, **59**(2) [cit. 2023-07-12]. ISSN 0090-3558. Dostupné z: doi:10.7589/JWD-D-22-00063

ARMOUR, N. K. a N. FERGUSON-NOEL, 2015. Evaluation of the egg transmission and pathogenicity of *Mycoplasma gallisepticum* isolates genotyped as ts-11. *Avian Pathology* [online]. 2015-07-04, **44**(4), 296-304 [cit. 2023-07-14]. ISSN 0307-9457. Dostupné z: doi:10.1080/03079457.2015.1044890

BARBOUR, E.K., S.K. HAMADEH a A. EIDT, 2000. Infection and immunity in broiler chicken breeders vaccinated with a temperature-sensitive mutant of *Mycoplasma gallisepticum* and impact on performance of offspring. *Poultry Science* [online].

79(12), 1730-1735 [cit. 2023-08-28]. ISSN 00325791. Dostupné z: doi:10.1093/ps/79.12.1730

BEKŐ, K., Z. KREIZINGER, K. M. SULYOK, et al., 2019. Genotyping *Mycoplasma gallisepticum* by multilocus sequence typing. *Veterinary Microbiology* [online]. **231**, 191-196 [cit. 2023-07-12]. ISSN 03781135. Dostupné z: doi:10.1016/j.vet-mic.2019.03.016

BENČINA, D., I. MRZEL, O. ZORMAN ROJS, A. BIDOVEC a A. DOVČ, 2003. Characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* strains involved in respiratory disease in pheasants and peafowl. *Veterinary Record* [online]. **152**(8), 230-234 [cit. 2023-07-12]. ISSN 00424900. Dostupné z: doi:10.1136/vr.152.8.230

BERAN, P., D. STEHLÍKOVÁ, S. P. COHEN, V. ČURN a P. ROBINSON, 2021. KEC: unique sequence search by K-mer exclusion. *Bioinformatics* [online]. 2021-10-01, **37**(19), 3349-3350 [cit. 2024-04-17]. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btab196

BIRDSELL, D. N., T. PEARSON, E. P. PRICE, et al., 2012. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): A functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLOS ONE* [online]. 2012-3-16, **7**(3) [cit. 2023-11-18]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0032866

BOGUSLAVSKY, S., D. MENAKER, I. LYSNYANSKY, T. LIU, S. LEVISOHN, R. ROSENGARTEN, M. GARCIA a D. YOGEV, 2000. Molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* pvpA gene which encodes a putative variable cytoadhesin protein. *Infection and Immunity* [online]. 2000(68:7), 3956-3964 [cit. 2024-03-26]. Dostupné z: doi:doi.org/10.1128/iai.68.7.3956-3964.2000

BRADBURY, J. M., O. M. S. ABDUL-WAHAB, C. A. YAVARI, J.-P. DUPIELLET a J. M. BOVE, 1993. *Mycoplasma imitans* sp. nov. is related to *Mycoplasma gallisepticum* and found in birds. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online].

1993-10-01, 43(4), 721-728 [cit. 2024-03-18]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-43-4-721

BRANTON, S. L. a J. W. DEATON, 1985. Egg production, egg weight, eggshell strength, and mortality in three strains of commercial layers vaccinated with F strain *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian diseases* [online]. **29**(3), 832-837 [cit. 2023-08-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4074249/>

CHEN, H., S. YU, M. HU, X. HAN, D. CHEN, X. QIU a CH. DING, 2012. Identification of biofilm formation by *Mycoplasma gallisepticum*. *Veterinary Microbiology* [online]. **161**(1-2), 96-103 [cit. 2023-07-13]. ISSN 03781135. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.013

DEEKSHIT, V. K., K. JAZEELA, G. CHAKRABORTY, A. ROHIT, A. CHAKRABORTY a I. KARUNASAGAR, 2019. Mismatch amplification mutation assay-polymerase chain reaction: A method of detecting fluoroquinolone resistance mechanism in bacterial pathogens. *Indian Journal of Medical Research* [online]. **149**(2), 146-150 [cit. 2023-11-15]. ISSN 0971-5916. Dostupné z: doi:10.4103/ijmr.IJMR_2091_17

DEHIO, CH., S. D. GRAY-OWEN a T. F. MEYER, 2000. Host cell invasion by pathogenic *Neisseriae*. In: *Bacterial invasion into eukaryotic cells*. Boston, MA: Springer US, s. 61-96. Subcellular Biochemistry. ISBN 978-1-4419-3330-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4757-4580-1_4

DYBVIK, K. a L. L. VOELKER, 1996. Molecular biology of mycoplasmas. *Annual Review of Microbiology* [online]. **50**(1), 25-57 [cit. 2023-07-11]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.50.1.25

EDWARD, D. G. ff. a A. D. KANAREK, 1960. Organisms of the pleuropneumonia group of avian origin: their classification into species. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 79(10), 696-702 [cit. 2024-04-16]. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.1960.tb42744.x

EL GAZZAR, M., V. A. LAIBINIS a N. FERGUSON-NOEL, 2011. Characterization of a ts-11–like *Mycoplasma gallisepticum* isolate from commercial broiler chickens. *Avian Diseases* [online]. **55**(4), 569-574 [cit. 2023-08-24]. ISSN 0005-2086. Dostupné z: doi:10.1637/9689-021711-Reg.1

ELLIOTT, K.E.C., S.L. BRANTON, J.D. EVANS a E.D. PEEBLES, 2019. Occurrence of horizontal transmission in layer chickens after administration of an in ovo strain F *Mycoplasma gallisepticum* vaccine ., *Poultry Science* [online]. **98**(10), 4492-4497 [cit. 2023-07-13]. ISSN 00325791. Dostupné z: doi:10.3382/ps/pez306

EVANS, R. D. a Y. S. HAFEZ, 1992. Evaluation of a *Mycoplasma gallisepticum* strain exhibiting reduced virulence for prevention and control of poultry mycoplasmosis. *Avian Diseases* [online]. **36**(2), 197-201 [cit. 2023-08-28]. ISSN 00052086. Dostupné z: doi:10.2307/1591490

FERGUSON-NOEL, N. M. a S. M. WILLIAMS, 2015. The efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* K-strain live vaccine in broiler and layer chickens. *Avian Pathology* [online]. 2015-03-05, **44**(2), s. 75-80 [cit. 2023-08-28]. ISSN 0307-9457. Dostupné z: doi:10.1080/03079457.2015.1005054

FERGUSON-NOEL, N., K. COOKSON, V. A. LAIBINIS a S. H. KLEVEN, 2012. The efficacy of three commercial *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in laying hens. *Avian Diseases* [online]. **56**(2), s. 272-275 [cit. 2023-08-28]. ISSN 0005-2086. Dostupné z: doi:10.1637/9952-092711-Reg.1

GATES, A.E., S. FRASCA, A. NYAOKE, T.S. GORTON, L.K. SILBART a S.J. GEARY, 2008. Comparative assessment of a metabolically attenuated *Mycoplasma gallisepticum* mutant as a live vaccine for the prevention of avian respiratory mycoplasmosis. *Vaccine* [online]. **26**(16), 2010-2019 [cit. 2023-09-03]. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2008.02.010

GAUNSON, J, C PHILIP, K WHITHEAR a G BROWNING, 2006. Age related differences in the immune response to vaccination and infection with *Mycoplasma gallisepticum*. *Vaccine* [online]. 2006-03-06, **24**(10), s. 1687-1692 [cit. 2023-08-28]. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2005.09.045

GRAHAM, J. E. a T. R. SCHOEB, 2011. *Mycoplasma pulmonis* in Rats. *Journal of Exotic Pet Medicine* [online]. 20(4), s. 270-276 [cit. 2024-03-22]. ISSN 15575063. Dostupné z: doi:10.1053/j.jepm.2011.07.004

GRÓZNER, D., K. M. SULYOK, Z. KREIZINGER, et al., 2019. Detection of *Mycoplasma anatis*, *M. anseris*, *M. cloacale* and *Mycoplasma* sp. 1220 in waterfowl using species-specific PCR assays. *PLOS ONE* [online]. 2019-7-11, 14(7), 1-10 [cit. 2024-04-17]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0219071

HASHEMI, S., M. MAHZOUNIEH, N. SHEIKHI a A. EBRAHIMI, 2018. Application of high-resolution melting-curve analysis on *pvpA* gene for detection and classification of *Mycoplasma gallisepticum* strains. *Microbial Pathogenesis* [online]. 124(1), 365-371 [cit. 2024-04-03]. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2018.06.032

HAUBOLD, B., F. KLÖTZL, L. HELLBERG, D. THOMPSON, M. CAVALAR a T. PRZYTYCKA, 2021. Fur: Find unique genomic regions for diagnostic PCR. *Bioinformatics* [online]. 2021-08-01, 37(15), 2081-2087 [cit. 2024-04-16]. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btab059

HERRMANN, M., P. E. VAUDAUX, D. PITTET, R. AUCKENTHALER, P. D. LEW, F. SCHUMACHER PERDREAU, G. PETERS a F. A. WALDVOGEL, 1988. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. 1988-10-01, **158**(4), s. 693-701 [cit. 2023-11-18]. ISSN 1537-6613. Dostupné z: doi:10.1093/infdis/158.4.693

HUANG, A., S. WANG, J. GUO, et al., 2021. Prudent use of tylosin for treatment of *Mycoplasma gallisepticum* based on its clinical breakpoint and lung microbiota shift.

Frontiers in Microbiology [online]. 2021-9-9, **12** [cit. 2023-07-14]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.712473

JACKSON, S. A., R. E. MCKENZIE, R. D. FAGERLUND, S. N. KIEPER, P. C. FINERAN a S. J. J. BROUNS, 2017. CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science* [online]. 2017-04-07, 356(6333), 5 [cit. 2024-04-10]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aal5056

JÁNOVÁ, N., 2023. Použití MLST markerů pro identifikaci druhu a kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* [online]. České Budějovice [cit. 2024-04-02]. Dostupné z: https://theses.cz/id/cj1m0i/Janova_Nicole_2023_DP.pdf. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

JIANG, H.X., J. R. CHEN, H. L. YAN, X. N. LI, Z. L. CHEN a Z. L. ZENG, 2009. Molecular variability of *DR-1* and *DR-2* within the *pvpA* gene in *Mycoplasma gallisepticum* isolates. *Avian Diseases* [online]. 53(1), 124-128 [cit. 2024-04-03]. ISSN 0005-2086. Dostupné z: doi:10.1637/8338-042908-ResNote.1

JIANG, Z., S. LI, C. ZHU, R. ZHOU a P. H. M. LEUNG, 2021. *Mycoplasma pneumoniae* infections: Pathogenesis and vaccine development. *Pathogens* [online]. **10**(2) [cit. 2023-07-13]. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens10020119

KANCI CONDELLO, A., S. N. KULAPPU ARACHCHIGE, P. K. SHIL, G. J. UNDERWOOD, A. H. NOORMOHAMMADI, P. F. MARKHAM, N. K. WAWEGAMA a G. F. BROWNING, 2020. Duration of protective immunity induced by *Mycoplasma gallisepticum* strain ts-304 vaccine in chickens. *Veterinary Microbiology* [online]. **251** [cit. 2023-08-28]. ISSN 03781135. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2020.108883

KLEVEN, S.H. a N. FERGUSON-NOEL, 2008. *Mycoplasma imitans* infection. In: FADLY, A.M., J.R. GLISSON, L.R. MCDUGALD, L.K. NOLAN a D.E. SWAYNE, ed. *Diseases of Poultry* [online]. 12th ed. Ames: Blackwell Publishing, s. 862 [cit. 2024-02-18]. ISBN 978-0-8138-0718-8/2008. Dostupné z: <https://himakahaunhas.files.wordpress.com/2013/03/disease-of-poultry.pdf>

KORESSAAR, T. a M. REMM, 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* [online]. 2007-05-15, **23**(10), s. 1289-1291 [cit. 2024-01-23]. ISSN 1367-4811. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btm091

LEY, D.H., 2008. Mycoplasma gallisepticum infection. In: FADLY, A.M., J.R. GLISSON, L.R. MCDOUGALD, L.K. NOLAN a D.E. SWAYNE, ed. *Diseases of Poultry* [online]. 12th ed. Ames: Blackwell Publishing, s. 807-821 [cit. 2023-07-12]. ISBN 978-0-8138-0718-8/2008. Dostupné z: <https://himakahaunhas.files.wordpress.com/2013/03/disease-of-poultry.pdf>

LIMSATANUN, A., K. LIMPAVITHAYAKUL a T. PRASERTSEE, 2022. Targeted sequencing analysis of *Mycoplasma gallisepticum* isolates in chicken layer and breeder flocks in Thailand. *Scientific Reports* [online]. **2022**(12) [cit. 2023-08-17]. Dostupné z: <https://web.s.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=ded386f2-38f3-48de-a7f0-0ec0a6906d98%40redis>

LIN, M. Y. a S. H. KLEVEN, 1984. Evaluation of attenuated strains of *Mycoplasma gallisepticum* as vaccines in young chickens. *Avian Diseases* [online]. **28**(1), 88-99 [cit. 2023-08-28]. ISSN 00052086. Dostupné z: doi:10.2307/1590131

MATUCCI, A., E. STEFANI, A. TONDO, V. RIGHETTI, M. BOTTINELLI, L. GAVAZZI, M. MERENDA a S. CATANIA, 2023. Isolation and characterization of an atypical *Mycoplasma gallisepticum* strain showing a new *mgc2* variant. *Veterinary Microbiology* [online]. **282**, 1-7 [cit. 2023-07-12]. ISSN 03781135. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2023.109768

MATUCCI, A., E. STEFANI, M. GASTALDELLI, I. ROSSI, G. DE GRANDI, M. GYURANECZ a S. CATANIA, 2020. Molecular differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* outbreaks: A last decade study on italian farms using GTS and MLST. *Vaccines* [online]. **8**(4) [cit. 2023-07-14]. ISSN 2076-393X. Dostupné z: doi:10.3390/vaccines8040665

MAY, M., L. PAPAIZISI, T. S. GORTON a S. J. GEARY, 2006. Identification of fibronectin-binding proteins in *Mycoplasma gallisepticum* strain R. *Infection and Immunity* [online]. 74(3), 1777-1785 [cit. 2024-03-26]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.74.3.1777-1785.2006

MAYA, L., G. GÓMEZ-VERDUZCO, F. J. TRIGO-TAVERA, L. MORENO-FIERROS, V. ROJAS-TREJO a R. E. MIRANDA-MORALES, 2024. A comparative in silico analysis of the *vlhA* gene regions of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* isolates from commercial hen farms in Mexico. *Microbiology Society* [online]. 2024(3), 1-10 [cit. 2024-04-03]. Dostupné z: doi:10.1099/acmi.0.000760.v2

MOURAD, D., 2023. Genotypic characterization of mycoplasma species isolated from turkey flocks. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences* [online]. 2023-12-01, 54(6), 1121-1130 [cit. 2023-11-28]. ISSN 2357-089X. Dostupné z: doi:10.21608/ejvs.2023.213016.1508

MUGUNTHAN, S. P., G. KANNAN, H. M. CHANDRA a B. PAITAL, 2023. Infection, transmission, pathogenesis and vaccine development against *Mycoplasma gallisepticum*. *Vaccines* [online]. 11(2), 1-2 [cit. 2023-07-11]. ISSN 2076-393X. Dostupné z: doi:10.3390/vaccines11020469

NICHOLAS, R., R. AYLING a L. MCAULIFFE, ed., 2008. *Mycoplasma diseases of ruminants* [online]. UK: *CAB International* [cit. 2023-07-11]. ISBN 9780851990125. Dostupné z: doi:10.1079/9780851990125.0000

NOORMOHAMMADI, A.H., 2007. Role of phenotypic diversity in pathogenesis of avian mycoplasmosis. In: *Avian Pathology* [online]. 36:6. Houghton Trust, s. 439-444 [cit. 2024-03-26]. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079450701687078>

NYBERG, P., M. RASMUSSEN, U. VON PAWEL-RAMMINGEN a L. BJÖRCK, 2004. SpeB modulates fibronectin-dependent internalization of *Streptococcus pyogenes* by efficient proteolysis of cell-wall-anchored protein F1. *Microbiology* [online].

2004-05-01, **150**(5), 1559-1569 [cit. 2023-11-18]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.27076-0

OLSON, N.O., K.M. KERR, and A. Campbell, 1964. Control of infectious synovitis. In: *Avian Diseases* 8:209-214.

PAPAZISI, L., S. FRASCA, M. GLADD, X. LIAO, D. YOGEV a S. J. GEARY, 2002. *GapA* and *CrmA* coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytodherence and virulence. *Infection and Immunity* [online]. 70(12), 6839-6845 [cit. 2024-03-26]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.70.12.6839-6845.2002

PAPOUŠKOVÁ, A., M. MASAŘÍKOVÁ a A. ČÍŽEK, 2020. Antimikrobiální rezistence a gramnegativní bakterie. In: *Veterinární bakteriologie II* [online]. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, s. 181 [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://www.vfu.cz/files/upload/prorektor%20pro%20strategii%20a%20rozvoj/1240_05_v%C3%BDstup_Vybran%C3%A9%20kapitoly%20z%20veterin%C3%A1rn%C3%AD%20bakteriologie%20II%202020.pdf

PFLAUM, K., E. R. TULMAN, J. BEAUDET, J. CANTER, S. J. GEARY a S. M. PAYNE, 2018. Variable lipoprotein hemagglutinin A gene (*vlhA*) expression in variant *Mycoplasma gallisepticum* strains in vivo. *Infection and Immunity* [online]. 86(11), e00524-18 [cit. 2024-03-26]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.00524-18

POCKRANDT, Ch., M. ALZAMEL, C. S. ILIOPOULOS, K. REINERT aj. XU, 2020. GenMap: ultra-fast computation of genome mappability. *Bioinformatics* [online]. 2020-06-15, 36(12), 3687-3692 [cit. 2024-04-16]. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btaa222

RAVIV, Z., S. A. CALLISON, N. FERGUSON-NOEL a S. H. KLEVEN, 2008. Strain differentiating real-time PCR for *Mycoplasma gallisepticum* live vaccine evaluation studies. *Veterinary Microbiology* [online]. 129(1-2), 179-187 [cit. 2024-04-11]. ISSN 03781135. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2007.11.017

RAZIN, S., D. YOGEV a Y. NAOT, 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. **62**(4), 1094-1156 [cit. 2023-07-12]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998

ROMAN, F., A. M. IÑIGUEZ, M. YEO a A. M. JANSEN, 2018. Multilocus sequence typing: genetic diversity in *Trypanosoma cruzi* I (TcI) isolates from Brazilian didelphids. *Parasites and vectors* [online]. 11(1), 107 [cit. 2024-04-02]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/s13071-018-2696-9

SAWICKA, A., M. DURKALEC, G. TOMCZYK, O. KURSA a G. WOŹNIAKOWSKI, 2020. Occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* [online]. 2020-4-16, **15**(4) [cit. 2023-07-12]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0231545

SETO, S., T. KENRI, T. TOMIYAMA a M. MIYATA, 2005. Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions. *Journal of Bacteriology* [online]. 2005(187:5), 1875-1877 [cit. 2024-03-26]. Dostupné z: doi:doi/10.1128/jb.187.5.1875-1877.2005

SILLEY, P., S. SIMJEE a S. SCHWARZ, 2012. Surveillance and monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic consumption in humans and animals. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* [online]. 2012-04-01, **31**(1), 105-120 [cit. 2023-08-24]. ISSN 0253-1933. Dostupné z: doi:10.20506/rst.31.1.2100

SULYOK, K. M., Z. KREIZINGER, K. BEKŐ, et al., 2019. Development of molecular methods for rapid differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains from field isolates. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 57(6), e01084-18 [cit. 2024-04-17]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01084-18

TULMAN, E. R., X. LIAO, S. M. SZCZEPANEK, D. H. LEY, G. F. KUTISH a S. J. GEARY, 2012. Extensive variation in surface lipoprotein gene content and genomic changes associated with virulence during evolution of a novel North American house

finch epizootic strain of *Mycoplasma gallisepticum*. *Microbiology* [online]. 2012-08-01, 158(8), 2073-2088 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.058560-0

UNTERGASSER, A., I. CUTCUTACHE, T. KORESSAAR, J. YE, B. C. FAIRCLOTH, M. REMM a S. G. ROZEN, 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* [online]. 2012-8-01, **40**(15), e115-e115 [cit. 2024-01-23]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks596

VANCE, A.M., S.L. BRANTON, S.D. COLLIER, P.D. GERARD a E.D. PEEBLES, 2008. Effects of prelay ts11-strain *Mycoplasma gallisepticum* inoculation and time-specific F-strain *M. gallisepticum* inoculation overlays on internal egg and eggshell characteristics of commercial laying hens. *Poultry Science* [online]. **87**(7), 1358-1363 [cit. 2023-08-28]. ISSN 00325791. Dostupné z: doi:10.3382/ps.2008-00099

WEINBERG, Z., J. X WANG, J. BOGUE, J. YANG, K. CORBINO, R. H MOY a R. R BREAKER, 2010. Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genome Biology* [online]. **11**(3) [cit. 2023-11-18]. ISSN 1465-6906. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2010-11-3-r31

YAMAMOTO, R., C. H. BIGLAND a H. B. ORTMAYER, 1965. Characteristics of *Mycoplasma meleagridis* sp. n., Isolated from Turkeys. *Journal of Bacteriology* [online]. 90(1), 47-49 [cit. 2024-04-16]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.90.1.47-49.1965

YU, Y., L. ZHANG, Y. CHEN, Y. LI a Z. WANG, 2019. *GroEL* protein (heat shock protein 60) of *Mycoplasma gallisepticum* induces apoptosis in host cells by interacting with annexin A2. *Infection and Immunity* [online]. 87(9), e00248-19 [cit. 2024-03-26]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.00248-19

ZHANG, G., L. HAN, Z. LI, Y. CHEN, Q. LI, S. WANG a H. SHI, 2023. Screening of immunogenic proteins and evaluation of vaccine candidates against *Mycoplasma synoviae*. *Npj Vaccines* [online]. **8**(1), 1 [cit. 2023-11-27]. ISSN 2059-0105. Dostupné z: doi:10.1038/s41541-023-00721-y

ZHANG, L., 2018. Multi-epitope vaccines: a promising strategy against tumors and viral infections. *Nature* [online]. **15**(2), 182-184 [cit. 2023-09-03]. ISSN 1672-7681. Dostupné z: doi:10.1038/cmi.2017.92

ZHOU, Q., K. MAI, D. YANG, et al., 2021. Comparative genomic analysis of *Mycoplasma anatis* strains. *PubMed central* [online]. 43(11), 1327-1337 [cit. 2024-03-18]. ISSN 1976-9571. Dostupné z: doi:10.1007/s13258-021-01129-5

.

Seznam internetových zdrojů

LABGUIDE, 2020. Real time PCR. *LABGuide* [online]. [cit. 2023-11-14]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

MASARYKOVA UNIVERZITA, [2020]. Predikce genů a anotace sekvence DNA [online]. [cit. 2024-04-09]. Dostupné z: https://is.muni.cz/www/98951/41610771/43823411/43823458/Analyza_genomick/55450383/Anotace150227.pdf

Seznam obrázků a grafů

Obr. č.1 - Závislost pozice čtení nukleotidu na Phred skóre.....	23
Obr. č.2 - Gelová elektroforéza – primer <i>171F/R</i> v rozmezí 58,9-61,8°C.....	34
Obr. č.3 - Gelová elektroforéza – primer <i>213F/R</i> v rozmezí 58,9-61,8°C.....	35
Obr. č.4 - Gelová elektroforéza I vzorků – primery <i>171F/R</i> a <i>213F/R</i>	36
Obr. č.5 - Gelová elektroforéza II vzorků – primery <i>171F/R</i> a <i>213F/R</i>	37
Graf 1 - Křivky tání primerů <i>213F/R</i>	34
Graf 2 - Křivky amplifikace vzorků při použití primerů <i>213F/R</i>	35
Graf 3 - Křivky tání primerů <i>171F/R</i>	35
Graf 4 - Křivky amplifikace vzorků při použití primerů <i>171F/R</i>	36
Graf 5 - Křivky tání primerů <i>169F/R</i>	36
Graf 6 - Křivky amplifikace vzorků při použití primerů <i>169F/R</i>	37
Graf 7 - Křivky tání primerů <i>188F/R</i>	38
Graf 8 - Křivky amplifikace vzorků při použití primerů <i>188F/R</i>	38
Graf 9 - Křivky tání primerů <i>199F/R</i>	39
Graf 10 - Křivky amplifikace vzorků při použití primerů <i>199F/R</i>	39
Graf 11 - Křivky amplifikace při analýze druhové specificity u primerů <i>213F/R</i>	44

Seznam tabulek

Tabulka I – Sekvence pro navržení primerů a jejich funkce v analýze.....	31
Tabulka II – Sekvence vybraných primerů na základě softwarové analýzy.....	31
Tabulka III – Reakční schéma real time PCR.....	32
Tabulka IV – Optimalizované podmínky PCR pro primery 171F/R a 213F/R.....	33
Tabulka V – Souhrn použitých vzorků pro stanovení druhové specificity.....	42

Seznam použitých zkratek

ARV – ptačí reovirus (z angl. avian reovirus)

CRD – chronická respirační nemoc (z angl. Chronic Respiratory Disease)

C_t – prahový cyklus (z angl. cycle of treshold)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)

ELISA – test enzymově vázaných imunisorbentů (z angl. Enzym-linked Immunosorbent Assay)

FRET – Försterův/fluorescenční rezonanční energotransfer (z angl. Förster/fluorescence resonance energy transfer)

IBV – virus infekční bronchitidy (z angl. Infectious Bronchitis Virus)

MAMA – test nesouhlasné mutační amplifikace (z angl. Mismatch Amplification Mutation Assay)

MA – *Mycoplasma anatis*

MI – *Mycoplasma imitans*

MG – *Mycoplasma gallisepticum*

MLST – metodologický postup přepisu několika lokusů zároveň (z angl. Multi-locus sequence typing)

MM – *Mycoplasma meleagridis*

MP – *Mycoplasma pulmonis*

MS – *Mycoplasma synoviae*

NCBI – Národní centrum pro biotechnologické informace (z angl. National center for Biotechnology Information)

NDV – virus Newcastlovského onemocnění (z angl. Newcastle disease virus)

OLC – konsensus překrývajících se sekvencí (z angl. Overlap layout consensus)

ORF – otevřený čtecí rámec (z angl. open reading frame)

PCR – polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)

RAPD-PCR – polymerázová řetězová reakce náhodně amplifikované polymorfni DNA (z angl. Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction)

WOAH – Světová zdravotnická organizace pro zdraví zvířat (z angl. World Organisation for Animal Health)
