

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B0914P360004

Radek Halama

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**VYUŽITÍ MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÝCH METOD
V KLINICKÉ MIKROBIOLOGII**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Chudějová, Ph.D.

PLZEŇ 2023

Na této stránce je vloženo zadání bakalářské práce.

Na této stránce je vloženo zadání bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 3. 2023

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Halama Radek

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Využití molekulárně-genetických metod v klinické mikrobiologii

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Chudějová, Ph.D.

Počet stran – číslované: 45

Počet stran – nečíslované: 24

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 70

Klíčová slova: Izolace DNA, PCR, elektroforéza, sekvenace

Souhrn:

Tato bakalářská práce je zaměřena na využití molekulárně-genetických metod v klinické mikrobiologii. Práce je rozdělena na dvě hlavní části – teoretickou a praktickou. Teoretická část je zaměřena na popis principů molekulárně-genetických metod a na jejich využití v klinické mikrobiologii. Praktická část se zaměřuje na statistické zpracování výsledků PCR detekce *Chlamydia trachomatis* zpracovávaných ve Fakultní nemocnici Plzeň za období 2021-2022.

Abstract

Surname and name: Halama Radek

Department: Department of Paramedical Science, Medical Diagnostics Studies and Public Health

Title of thesis: The use of Molecular Genetics Methods in Clinical Microbiology

Consultant: Mgr. Kateřina Chudějová, Ph.D.

Number of pages – numbered: 45

Number of pages – unnumbered: 24

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 70

Keywords: DNA isolation, PCR, electrophoresis, sequencing

Summary:

This Bachelor thesis is focused on the use of molecular genetics methods in clinical microbiology. This thesis is divided in two main parts – theoretical and practical. The theoretical part deals with principles of individual methods and their use in clinical microbiology. The practical part focuses on the statistical processing of the results of PCR detection of *Chlamydia trachomatis* processed at the Pilsen University Hospital for the period 2021-2022.

Předmluva

Téma mé bakalářské práce bylo zvoleno na základě mého zájmu o obor mikrobiologie a genetika. Na tomto základě jsem s vedoucí práce vybral téma „Využití molekulárně-genetických metod v klinické mikrobiologii“. Bakalářská práce by mohla rozšířit základní znalosti o metodách v mikrobiologii novým kolegům laborantům. Součástí této práce je rovněž praktická část, ve které jsem zpracoval statistické zhodnocení incidence bakterií *Chlamydia trachomatis*.

Poděkování

Děkuji Mgr. Kateřině Chudějové, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů. Dále děkuji Mgr. Kateřině Vlkové a pracovníkům Ústavu mikrobiologie FN Plzeň za poskytování odborných rad.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	12
SEZNAM OBRÁZKŮ	13
SEZNAM TABULEK	14
SEZNAM ZKRATEK	15
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST	18
1 STRUKTURA DNA.....	18
2 IZOLACE DNA.....	20
2.1 Izolační techniky	21
2.1.1 Fenol-chloroformová extrakce nukleových kyselin	21
2.1.2 Silikátové kolonky	21
2.1.3 Magnetické částice	22
3 MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ METODY VYUŽÍVANÉ V KLINICKÉ MIKROBIOLOGII	23
3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	23
3.2 Modifikace PCR reakce	25
3.2.1 End-point PCR.....	25
3.2.2 Real-Time PCR (RT-PCR).....	27
3.3 Ostatní modifikace PCR	28
3.3.1 Reverse Transcription PCR	28
3.3.2 Nested PCR	29
3.3.3 Hot-start PCR	29
3.3.4 Asymetrická PCR	30
3.3.5 Izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP)	30
3.4 Využití PCR reakce pro diagnostiku infekčních onemocnění	31
3.4.1 Využití PCR v klinické bakteriologii	31
3.4.2 Využití PCR v klinické virologii	32
3.4.3 Využití PCR v klinické mykologii	32
3.4.4 Využití v klinické parazitologii	32
3.5 Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)	32
3.5.1 Využití PFGE v mikrobiologii	34
3.6 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP).....	34
3.6.1 Využití RFLP v mikrobiologii.....	35
3.7 Hybridizace	35
3.7.1 Southern blotting (Southernův přenos)	37
3.7.2 Northern blotting	38

3.7.3	Western blotting	38
3.7.4	Sendvičová hybridizace	38
3.7.5	In situ hybridizace	39
3.7.6	Využití hybridizačních technik v klinické mikrobiologii.....	40
3.8	Sekvenace DNA.....	40
3.8.1	První generace sekvenování	41
3.8.2	Sekvenování druhé generace	43
3.8.3	Sekvenování třetí generace (Sekvenování nové generace – NGS).....	44
3.8.4	Využití sekvenování v mikrobiologii	45
PRAKTICKÁ ČÁST		46
4	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	46
4.1	Hlavní cíl.....	46
4.2	Dílčí cíle.....	46
5	CHLAMYDIA TRACHOMATIS	47
5.1	Teoretický podklad	47
5.2	Možnosti diagnostiky.....	48
5.3	Diagnostika ve FN Plzeň	48
6	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT INCIDENCE CHLAMYDIA TRACHOMATIS V LETECH 2021-2022 VE FN PLZEŇ.....	50
DISKUZE		58
ZÁVĚR.....		60
SEZNAM LITERATURY		61
SEZNAM PŘÍLOH		68
PŘÍLOHY		69
Příloha A – Povolení sběru informací ve Fakultní nemocnici v Plzni		69

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Podíl pozitivních a negativních výsledků detekce <i>Ch. trachomatis</i> za rok 2021 a 2022	50
Graf 2 Testované materiály mužské populace za období 2021-2022.....	51
Graf 3 Testované materiály od ženské populace za období 2021-2022.....	52
Graf 4 Nejčastější diagnózy pacientů s podezřením na infekci způsobenou <i>Ch. trachomatis</i>	54
Graf 5 Porovnání pozitivních záchytů <i>Ch. trachomatis</i> napříč lety 2021 a 2022.....	55
Graf 6 Přehled jednotlivých oddělení s počty přijatých materiálů za období 2021-2022	57

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura DNA.....	19
Obrázek 2 Schéma izolace DNA pomocí magnetických částic	22
Obrázek 3 Princip PCR reakce.....	25
Obrázek 4 Detekce produktů PCR pomocí gelové elektroforézy	26
Obrázek 5 Amplifikační graf.....	28
Obrázek 6 Schéma provedení pulzní gelové elektroforézy.....	33
Obrázek 7 Schéma provedení Southern blottingu.....	38
Obrázek 8 Schéma FISH.....	39
Obrázek 9 Princip Sangerova sekvenování.....	42

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Testované materiály mužské populace za období 2021-2022	51
Tabulka 2 Testované materiály od ženské populace za období 2021-2022.....	52
Tabulka 3 Přehled jednotlivých oddělení s celkovým počtem přijatých vzorků	56

SEZNAM ZKRATEK

dATP	Deoxyadenosin trifosfát
dCTP	Deoxycytidin trifosfát
dGTP	Deoxyguanosin trifosfát
DNA.....	Deoxyribonukleová kyselina
dTTP	Deoxythymidin trifosfát
dsDNA	Dvouvláknová DNA (z ang. <i>Double-stranded DNA</i>)
ELISA	Enzymoimunoanalýza
FISH.....	Fluorescenční in situ hybridizace
FN Plzeň	Fakultní nemocnice Plzeň
LAMP	Izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou
MIF	Mikroimunofluorescence
NK.....	Nukleová kyselina
PCR.....	Polymerázová řetězová reakce (z ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (z ang. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA.....	Ribonukleová kyselina
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (z ang. <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>)
SDS	Dodecylsulfát sodný
ssDNA.....	Jednovláknová DNA (z ang. <i>Single-stranded DNA</i>)
WGS.....	Celogenomové sekvenování (z ang. <i>Whole Genome Sequencing</i>)

ÚVOD

Tato bakalářská práce je zaměřena na téma využití molekulárně-genetických metod v oboru klinické mikrobiologie. Mikrobiologii je možné rozdělit do několika hlavních pododborů na základě zkoumaných mikroorganismů – a to na bakteriologii, virologii, mykologii a parazitologii. Mezi hlavní cíle všech mikrobiologických laboratoří patří informovat o přítomnosti mikroorganismů v biologickém materiálu, které mohou být příčinou onemocnění pacienta, dále daný patogen identifikovat, a v případě bakterií, popřípadě hub i definovat jejich případnou citlivost nebo rezistenci na antimikrobiální látky. K běžné diagnostice původců infekčních chorob jsou používány dvě základní skupiny vyšetření, které jsou obecně označovány jako přímý a nepřímý průkaz. [1, 2, 3]

Mezi nejčastěji používané metody přímého průkazu patogenů patří zejména mikroskopie a kultivace. Mikroskopie je nedílnou součástí identifikace mikroorganismů. Tím se stal mikroskop důležitým nástrojem používaným při mikrobiologické diagnostice patogenů, díky čemuž je možné popsat tvar, velikost, barvitelnost i pravděpodobnost nalezeného druhu bakterie. Kultivace mikrobů je možná na kultivačních půdách (převážně pro bakterie a houby) nebo v případě virů, které se obtížně kultivují, na buněčných kulturách. Bohužel největší nevýhodou mikroskopie a kultivace může být jejich nízká citlivost, což je způsobené například tím, že se ve vyšetřovaném vzorku zrovna nemusí patogen vyskytovat ve viabilní formě např.: po terapii antibiotiky. Nepřímý průkaz je naopak založen na detekci specifických protilátek, které se vytvářejí po prodělání onemocnění. Navzdory narůstající míře využití molekulárně-genetických metod je nepřímý průkaz i dnes hojně využíván. Naneštěstí v některých případech se můžou protilátky začít vyskytovat až několik měsíců či desítky let po vyléčení z nemoci. [1, 2, 3]

Samotná detekce a identifikace infekčního agens je každodenním problémem v mikrobiologické diagnostice. Běžná diagnostika je poměrně levná, ale v některých případech zdlouhavá a jsou s tím spojena určitá omezení, což vedlo k vzestupu nových tzv. molekulárně-genetických metod. Tyto metody se zejména používají pro detekci a identifikaci obtížně kultivovatelných či nekultivovatelných patogenů (virů, bakterií i parazitů), které nelze detekovat běžnými kultivačními technikami. Hlavním cílem těchto metod jsou nukleové kyseliny, které jsou součástí veškerých živých buněk. Do popředí se zejména dostala metoda polymerázová řetězová reakce (PCR), která je tak citlivá, že dokáže zachytit i velmi malé množství nukleové kyseliny patogenu. Mapování genomu

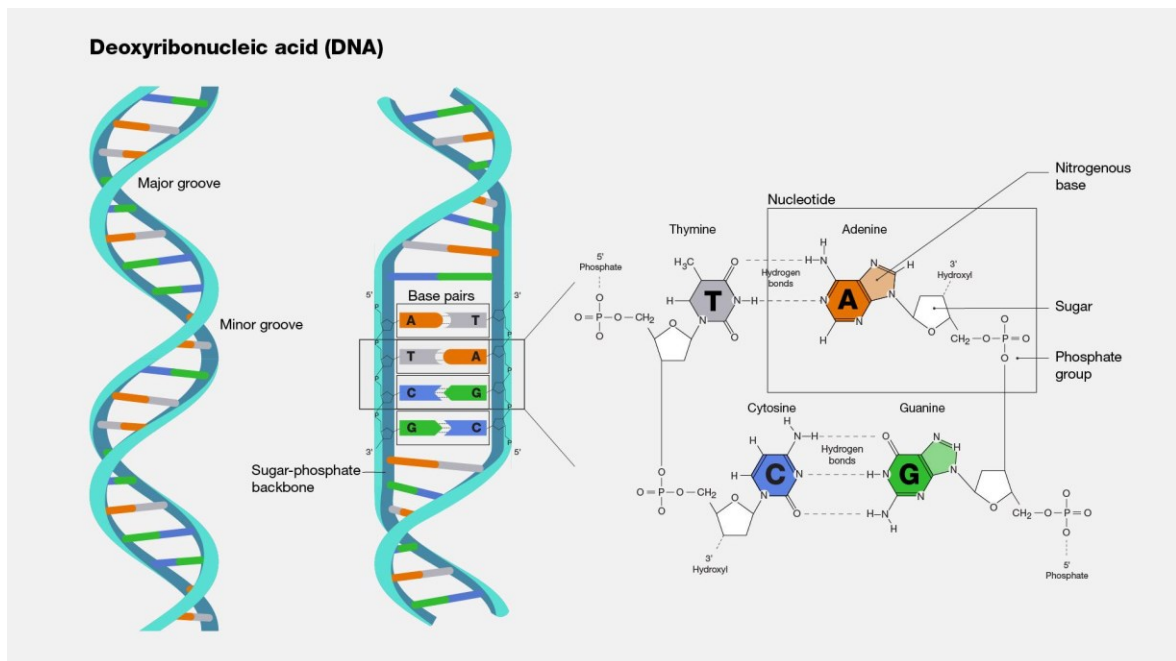
některých mikroorganismů sekvenací vedlo k zásadnímu kroku, a to k přípravě specifických primerů, které jsou nedílnou součástí všech PCR reakcí. [4] Metody založené na sekvenování vnesly do mikrobiologické praxe lepší pohled na klasifikaci, včetně identifikace bakterií, dále také například do problematiky antimikrobiální rezistence atd. Sekvenování v mnoha ohledech nahrazuje zastaralé metody založené na fenotypu, díky své rozlišovací schopnosti. Obecně je možné označit všechny metody spadající pod molekulárně-genetické, v oblasti diagnostiky v mikrobiologii za nenahraditelné a postupně se stávají mnohem dostupnějšími. [5]

Praktická část této bakalářské práce je zaměřena na laboratorní diagnostiku vybraného patogenu. Zvoleným patogenem byla *Chlamydia trachomatis*. Metodika práce byla prováděna pomocí metody RT-PCR pro stanovení pozitivivity či negativity patientských vzorků. Nedílnou součástí je poté samotná statistika, která byla vypracována za využití dat z laboratorního informačního systému Fakultní nemocnice v Plzni (FN Plzeň) na Ústavu mikrobiologie.

TEORETICKÁ ČÁST

1 STRUKTURA DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je makromolekula složená ze základních atomů a to dusíku, kyslíku, fosforu a vodíku. Poprvé byla DNA popsána Friedrichem Mieschenem, ale samotná struktura byla odhalena až později týmem vědců Jamesem Watsonem a Francisem Crickem. Zkoumání DNA ukázalo, že je tvořena dvěma řetězci, kdy každý řetězec obsahuje vždy fosforylovanou cukernou jednotku, zbytek kyseliny fosforečné tzv. fosfát a příslušnou dusíkatou bázi. Dusíkaté báze jsou heterocyklické sloučeniny, které jsou odvozeny buď od purinu, nebo pyrimidinu. Mezi purinové báze jsou řazeny adenin (A) a guanin (G), naopak mezi pyrimidinové cytosin (C) a thymin (T). Tyto báze jsou připojeny na pětiuhlíkatý cukr – deoxyribózu, konkrétně na prvním uhlíku. Dusíkaté báze takto navázané na nefosforylovaný cukr vytvářejí tzv. nukleosidy. Po fosforylaci je tato sloučenina nazývána jako tzv. nukleotid, což je základní stavební jednotka DNA. Po vytvoření tohoto polymeru je na jednom konci řetězce navázán fosfát a tento konec je označován jako 5' konec, zatímco na konci druhém je navázaná OH skupina a tento konec je označován jako 3' konec. Díky OH skupině je za přítomnosti enzymů tzv. polymeráz navázán další fosfát z dalšího nukleotidu a tím dochází k prodloužení řetězce. DNA je tvořena dvěma řetězci, které jsou navzájem propojeny pomocí vodíkových můstků mezi dusíkatými bázemi. Specificky se k sobě váží adenin a thymin tzv. dvojnou vazbou, a cytosin s guaninem tzv. trojnou vazbou. Tím dochází k párování bází a řetězce jsou k sobě komplementární. DNA je uspořádána do dvoušroubovice, kde platí, že jsou k sobě řetězce tzv. antiparalelní. Antiparalelní v tom smyslu, že jeden z řetězců je ve směru 5'→3' a druhý ve směru 3'→5'. [1, 3, 6, 7, 8] Na **Obrázku 1** je znázorněna struktura DNA.



Obrázek 1 Struktura DNA

Zdroj: National Human Genome Research Institute [online], citováno [13.2.2023].

Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Deoxyribonucleic-Acid>

2 IZOLACE DNA

Izolace DNA, někdy také označována jako extrakce DNA, je technika, při níž získáváme z biologického materiálu samotnou nukleovou kyselinu (NK). Může se jednat o jakýkoliv biologický materiál, jako jsou např. krevní vzorky, vlasy, nehty, tkáně, sliny, bukalní výtěry, sperma, moč atd. V mikrobiologii se dále využívá izolace DNA z bakteriálních kultur, a to až už narostlých na pevných (agary) nebo tekutých (bujóny) mediích. Základním cílem izolace je oddělení DNA přítomné v jádrech buněk od jiných buněčných složek. Extrakce od ostatních složek je důležitá, neboť přítomnost organických či anorganických složek v izolátu může do jisté míry interagovat s některými analýzami, což vede k poklesu kvality interpretace. Izolace DNA je tedy jedním z nejpotřebnějších postupů pro genetická testování v řadě různých oborů. Aby izolace nepodlehla kontaminacím, je nutné pracovat za sterilních podmínek a využívat ochranné pomůcky. [6, 9, 10, 11]

Izolace nukleových kyselin u prokaryotických a eukaryotických buněk

Cílem izolací nukleových kyselin ze vzorku je získání čisté DNA či RNA. Prvním krokem v tomto procesu je uvolnění obsahu samotné buňky, prostřednictvím rozrušení buněčné membrány. Pro uvolnění obsahu buněk, jsou běžně používány roztoky, tzv. detergenty. Tyto detergenty se liší různými vlastnostmi, ty mohou být založeny na povaze přítomnosti iontů (běžně používaným je například dodecylsulfát sodný) nebo naopak detergenty bez přítomnosti iontů (např. Triton X100). Dnes je možné využít i techniky, které nevyžadují použití detergentů, tyto techniky jsou běžně označovány za fyzikálně chemické, kdy je možné použít například ultrazvuk. Z uvolněného obsahu buněk je následně separována nukleová kyselina za využití například denaturace, dále vysrážení za přítomnosti organických rozpouštědel nebo metod jako je fenol-chloroformová separace a mnoho dalších. [10, 11]

Izolace nukleových kyselin virů

Viry jsou malé organismy, které je možné zařadit do kategorie tzv. nebuněčných živých soustav. Jejich základní částice, která je schopna vniknout do hostitelské buňky se nazývá virion. Každý takový virion se skládá ze dvou částí – nukleové kyseliny a proteinového obalu. Jelikož viry postrádají ribozomy a další buněčné organely pro syntézu energie, proteinů atd., je jejich přežití závislé právě na hostitelských buňkách.

Z toho vyplývá, že samotná izolace je velmi podobná jako klasická izolace prokaryotických nebo eukaryotických buněk. [3, 10, 11, 12, 13]

2.1 Izolační techniky

2.1.1 Fenol-chloroformová extrakce nukleových kyselin

Tato izolační metoda využívá vodného pufru, kde je volně rozptýlená nukleová kyselina. Tato metoda bývá preferována u vzorků s větším množstvím DNA. V pufru dochází k odstraňování ostatních složek lyzátu, zejména proteinů. K tomuto pufru je následně přidána směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Chloroform je látka organického původu a je nemísitelný s pufrům. Izoamylalkohol napomáhá rozpustnosti fenolu v chloroformu, což způsobí během intenzivního promíchávání směsi, že fenol postupně přechází do chloroformového prostředí. Následnou centrifugací dojde k oddělení jednotlivých fází, nejpatrnější je bílý prstenec mezi fázemi – vysrážené proteiny. Horní fáze vodného prostředí obsahuje nukleovou kyselinu, která je přenesena do nové čisté zkumavky. U některých izolací, zejména ze vzorků některých bakterií je nutná navíc extrakce polysacharidů, k tomuto účelu slouží cetyltrimetylamonium bromid. Nakonec je důležité odstranit zbytky fenolu, které mohou způsobovat interference některých analýz, a to přidáním jedné směsi chloroformu a izoamylalkoholu v poměru 24:1. [14]

Z takto vyčištěného roztoku je nutné vysrážet nukleovou kyselinu přidáním alkoholu (nejčastěji etanolu). Tím dojde k vysrážení nukleové kyseliny spolu se solemi a vytváří se tak mléčný zákal, který je možné pozorovat na dně zkumavky. Poté je potřeba tyto soli vymýt například alkoholem, s minimální koncentrací 70%. Tímto krokem došlo k separaci čisté nukleové kyseliny. Opět v závislosti na materiálu, který má být izolován, jsou voleny pomocné enzymy, jako jsou například ribonukleázy, to ovšem vyžaduje opětovné provedení celého postupu této extrakce. [14]

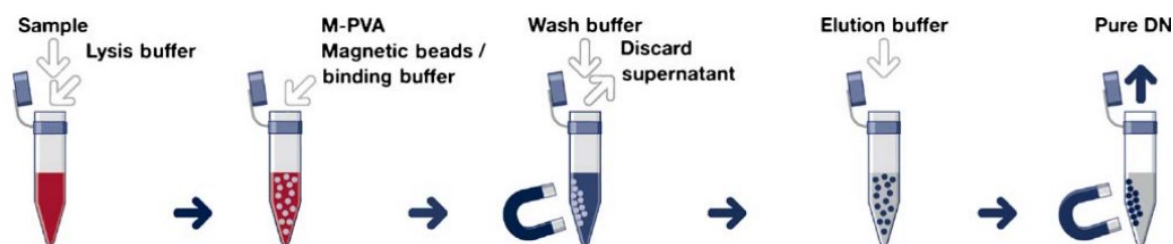
2.1.2 Silikátové kolonky

Principem izolace NK na kolonkách je vazba DNA nebo RNA na vrstvu různých silika-materiálů (například drceného borosilikátového skla nebo oxidu křemičitého), tato vrstva se nachází mezi dvěma fritami na kolonce. K samotné vazbě dochází za přítomnosti chaotropních solí (například guanidin hydrochlorid). Tyto soli mají schopnost vytěšňovat molekuly vody z nukleových kyselin, čímž dochází k potlačování jiných nežádoucích iontových interakcí. Následně po přidání isopropanolu nebo etanolu dochází

k částečnému vysrážení molekul DNA/RNA. Sílu vazby NK na silika-materiály ovlivňuje typ izolované nukleové kyseliny, iontová síla a pH roztok. Tato metoda je rychlá, přináší vysoký výtěžek, a hlavně vysoce čistou DNA. [3, 9]

2.1.3 Magnetické částice

Separační technika využívající paramagnetické částice je založena na principu, kdy jsou tyto magnetické částice speciálně upravené a získávají kladný náboj, cílová NK má náboj opačný – tedy negativní, a tím dochází k navázání NK na povrch těchto částic. Tato technika je ve velké míře využívána během posledních let v klinických laboratořích. Magnetické částice jsou vyráběny z oxidu železitého (Fe_2O_3) nebo také z oxidu železnato-železitého (Fe_3O_4). Částice jsou do jisté míry speciálně upravené tak, aby mohly vázat reverzibilně úseky nukleových kyselin. Do směsi, ve které se nachází již hotový lyzát biologického materiálu jsou přidány magnetické částice. Díky nim postupně dochází k nasedání přítomné nukleové kyseliny na povrch částic. Poté se k hraně zkumavky přiblíží magnet. Ten přitáhne magnetické částice s navázanou DNA a zbylý supernatant může být odsát. Následuje krok promytí, čímž jsou odstraněny nežádoucí složky směsi. V posledním kroku je do zkumavky přidán eluční pufr, který uvolní nukleové kyseliny z povrchu magnetických částic zpět do roztoku. [15] Princip separace DNA pomocí magnetických kuliček je znázorněn na **Obrázku 2**.



Obrázek 2 Schéma izolace DNA pomocí magnetických částic

Zdroj: BERENSMEIER, Sonja. *Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Applied microbiology and biotechnology*, 2006, 73.3: 495-504.

3 MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ METODY VYUŽÍVANÉ V KLINICKÉ MIKROBIOLOGII

Dnes existuje celá řada molekulárních metod k identifikaci různých druhů bakterií či virů. Některé vyžadují přítomnost velkého množství DNA, popřípadě RNA ve vzorku – hlavně u metod, u kterých nedochází k amplifikaci cílových sekvencí nukleových kyselin. Mezi tyto metody patří zejména bloty (např. Southern blot, Northern blot atd.). Naopak na amplifikaci založené metody jako je PCR, které jsou velmi senzitivní i specifické, fungují i při velmi nízkých koncentracích nukleových kyselin ve vzorku. Obecně pro výběr izolační metody je důležité zohlednit to, o jaké čistotě a v jakém množství je potřeba nukleová kyselina pro její navazující zpracování. Dále se bere zřetel na časovou i finanční náročnost. [6, 9, 10, 11]

3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

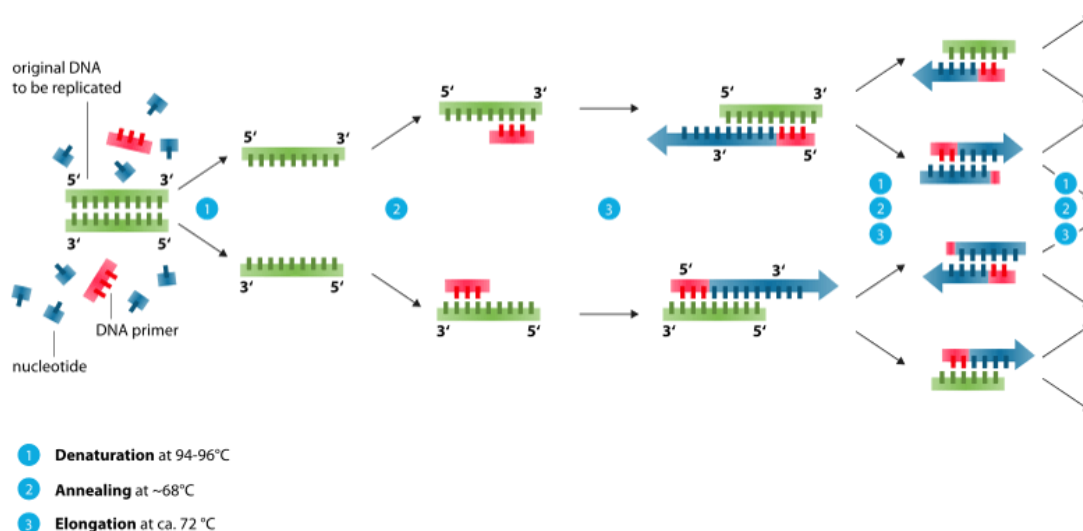
PCR metody jsou velmi všestranné a jejich uplatnění má široký rozsah, který zasahuje do řady oborů od mikrobiologie, forenzní medicíny, až po humánní genetiku. [16] Jedná se o jednoduchou enzymatickou metodu, při které je umožněno ze směsi DNA přítomné ve vzorku namnožit ty sekvence, které budou dále zkoumány. PCR reakce mohou být prováděny ze vzorků různých tkání, dále z periferní krve, kůže, vlasů slin a v případě mikrobiologie z různých mikroorganismů. Pro samotnou metodu stačí i jen stopové množství DNA, ze kterého je možné vytvořit až několik desítek tisíc kopií v běžném laboratorním prostředí. Na tomto základě je metoda považována za velmi citlivou. Samotná reakce probíhá však pouze za předpokladu, že jsou splněny optimální podmínky a že jsou nám známy okraje této sekvence, která bude amplifikována. Tohoto označení okrajů docílíme využitím tzv. primerů. [17] Tyto primery jsou chemicky syntetizované krátké sekvence oligonukleotidů o délce 15-30 nukleotidů s definovanou sekvencí, která je komplementární k cílovému úseku DNA, která je v reakci amplifikována. To dělá z primerů tzv. počáteční bod pro DNA polymerázu. [18]

Pro správný průběh každé PCR reakce je zapotřebí dostatečného množství deoxynukleotidů (dATP, dTTP, dGTP a dCTP), které slouží jako základní stavební kameny pro tvorbu nového vlákna DNA. Dále pak hořčnaté ionty, které zajišťují správnou funkci polymerázy. U těchto iontů je nutné dodržovat poměry koncentrací pro různé typy polymeráz, protože vlivem nízké koncentrace může dojít ke sníženému množství amplikonů, naopak při vysoké koncentraci může dojít k tvorbě nespecifických produktů. V neposlední

řadě je potřeba do reakční směsi přidávat termostabilní DNA polymerázu (např. Taq-polymeráza). Taq polymeráza byla získána izolací z bakterie *Thermus aquaticus*, odkud vzniklo označení „Taq“. Taq polymeráza je jedním z nejběžněji používaných enzymů pro PCR reakce. Vyznačuje se především svojí tepelnou odolností. Zůstává aktivní i při teplotách nad 90 °C. Tato polymeráza má obecně široké teplotní rozmezí, proto může dojít již během pokojové teploty k chybnému nasednutí polymerázy a následnému prodloužení řetězce ještě před začátkem vlastní reakce, což má za následek tvorbu nescifických produktů. Aby se tomuto jevu předešlo, byly zavedeny opatření, ať již ve složení Taq polymerázy dodávané komerčně nebo v pracovních postupech. V obou případech bylo zamezeno nescifické aktivitě až do počáteční fáze PCR. Jednou z dalších významností této polymerázy je nízká míra chybovosti, která se odhaduje přibližně na 1 chybu na 10 000 bází. [4, 18, 19]

PCR reakce probíhají ve speciálních zařízeních označovaných termocyklery. Tyto přístroje byly vytvořeny tak, aby dokázaly měnit teplotu reakce v poměrně krátkých časových intervalech. Díky cyklickému opakování změny teplot dochází k vytváření až milionu kopií námi označeného úseku DNA. [3]

PCR probíhá ve třech základních krocích a to denaturace, annealing a elongace. Během denaturačního kroku dochází k rozdělování dvouvláknové molekuly DNA (dsDNA) na jednotlivá vlákna (ssDNA) vlivem rozrušení vodíkových můstků při teplotě od 94 do 98 °C po dobu 20-45 sekund. Díky tomuto kroku je umožněno v dalším kroku nasednutí primerů na cílové sekvence vyšetřované DNA během tzv. annealingu. Annealing probíhá za nižší teploty přibližně při 55-65 °C (volená teplota je závislá na využívaném primeru) v intervalu 30-90 sekund. Tato specifická vazba vymezení tu oblast, která bude v cyklech PCR reakce amplifikována. V posledním kroku, tzv. elongaci, dochází k prodlužování nukleotidových řetězců vlivem DNA polymerázy, která k primerům napojuje nové nukleotidy. K prodlužování řetězců dochází ve směru 3' → 5' konci. Doba elongace se mění vlivem délky amplifikovaného úseku. [3, 18, 20] Proces PCR reakce znázorňuje **Obrázek 3**. Tyto kroky jsou součástí jednoho cyklu reakce. Tento postup je potřeba opakovat vícekrát. Pro dostatečně účinnou amplifikaci je zapotřebí většinou 30 až 40 cyklů. Tímto způsobem lze z jediného úseku DNA získat řádově až 10⁹ kopií. Ne vždy dosahuje metoda takového výtěžku, a to z důvodu postupného vyčerpávání složek v reakční směsi v průběhu amplifikace. [3, 18]



Obrázek 3 Princip PCR reakce

Zdroj: *MicrobiologyInfo.com*, 2023 [online], citováno [13.2.2023]. Dostupné z: <https://microbiologyinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-types-applications-and-animation/>

PCR může být provedena buď v simplexovém nebo multiplexovém provedení, kde simplex PCR využívá jen jeden pár primerů k amplifikaci jediné cílové DNA. Naopak multiplexová PCR, při které se do reakční směsi přidá několik párů primerů, je schopna rozpoznávat několik různých cílových sekvencí DNA, což umožní detekci hned několika genů najednou v jedné reakční směsi. [21]

Samotné reakční podmínky pro amplifikaci všech produktů je nutno optimalizovat. Hlavní výhodou této metody jsou nízké cenové náklady oproti samostatným amplifikacím. V mikrobiologii se tato metoda využívá pro detekci několika patogenů v jednom vzorku (např. diagnostika pohlavně přenosných onemocnění, respiračních infekcí či původců meningitid, a to jak bakteriálních, tak virových) a současně interních kontrol. [20]

3.2 Modifikace PCR reakce

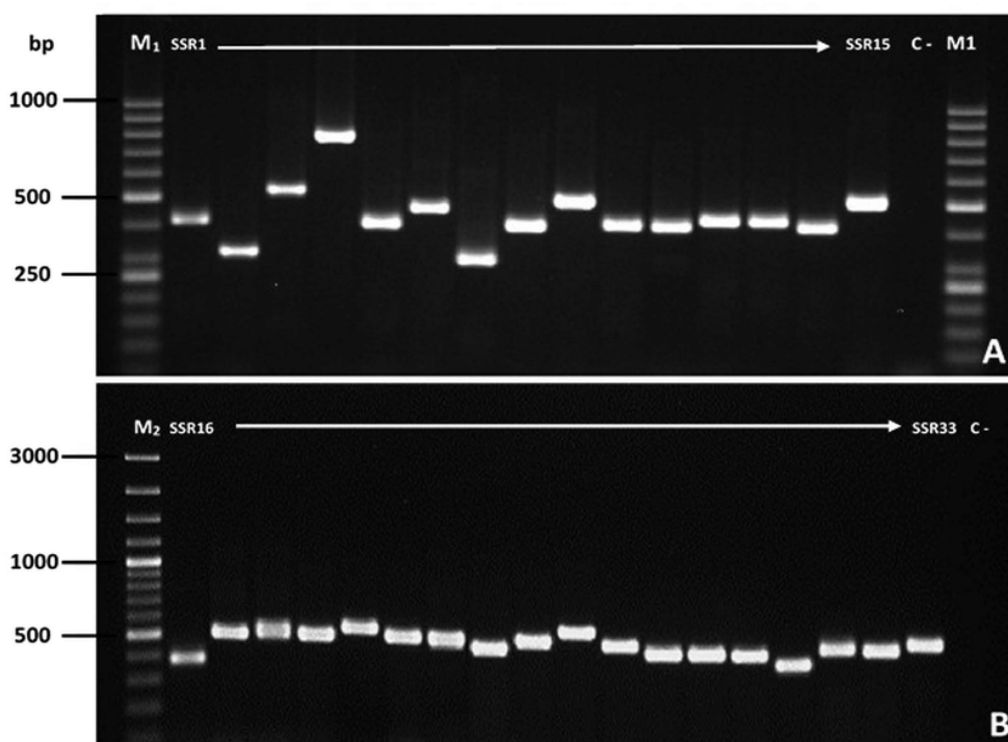
Existuje celá řada modifikací PCR reakce. Mezi nejčastěji využívané verze PCR reakce v mikrobiologii patří end-point PCR a Real-Time PCR.

3.2.1 End-point PCR

End-pointová reakce probíhá v termocykleru výše popsaným způsobem. Na rozdíl od Real-Time verze nejsou v tomto případě vznikající produkty reakce detekovány v průběhu PCR reakce. Produkty je tedy nutné vizualizovat jinými postupy.

Detekce end-point PCR produktů

Jednou z nejběžnějších metod detekce a separace amplifikované DNA po end-pointové PCR je gelová elektroforéza. Princip elektroforézy spočívá v pohybu molekul se záporným nábojem ve stejnosměrném elektrickém poli. Další důležitou vlastností je i molekulová hmotnost separovaných částic, velikost elektrického pole a v neposlední řadě i typ gelu a jeho porozitě. Běžně se tato metoda provádí na agarózovém či polyakrylamidovém gelu. Produkt PCR je následně vizualizován díky přidanému barvivu do elektroforetického gelu. Dříve bylo hojně využíváno barvivo ethidium bromid, od kterého se postupně opouští kvůli jeho karcinogenním účinkům. Dnes jsou častěji využívána komerční barviva jako SYBER Green, GelRED a další. Barvivem označený produkt je detekován v podobě signálů v UV oblasti světla (**Obrázek 4**).



Obrázek 4 Detekce produktů PCR pomocí gelové elektroforézy

Zdroj: Atia, M. A. M., Osman, G. H., & Elmenofy, W. H. (2016). *Genome-wide In Silico Analysis, Characterization and Identification of Microsatellites in Spodoptera littoralis Multiple nucleopolyhedrovirus (SpliMNPV)*. *Scientific Reports*, 6(1).

Nejčastěji je pro detekci PCR produktů používán již zmíněný agarózový gel. Jak již z názvu vyplývá je tento gel tvořen agarózou, což je polysacharid tvořený D-galaktózou a anhydro-L-galaktózou. Pro elektroforézu je vhodné používat gely s obsahem agarózy od 0,5 až 4%. Platí obecné pravidlo, čím více agarózy bude obsaženo v gelu,

tím bude jeho rozlišovací schopnost větší. K tomu se také pojí, že elektroforéza bude probíhat déle. Agarózové gely jsou vhodné k rozlišování delších amplikonů DNA. [17, 18]

Dále je možné v některých případech využívat polyakrylamidový gel, který vzniká polymerací akrylamidu za vzniku molekul polyakrylamidu. Tyto molekuly se mezi sebou pojí můstky a vytvářejí tak velmi hustou molekulovou síť. Polyakrylamidové gely jsou vhodné k rozlišování kratších amplikonů DNA. [18]

3.2.2 Real-Time PCR (RT-PCR)

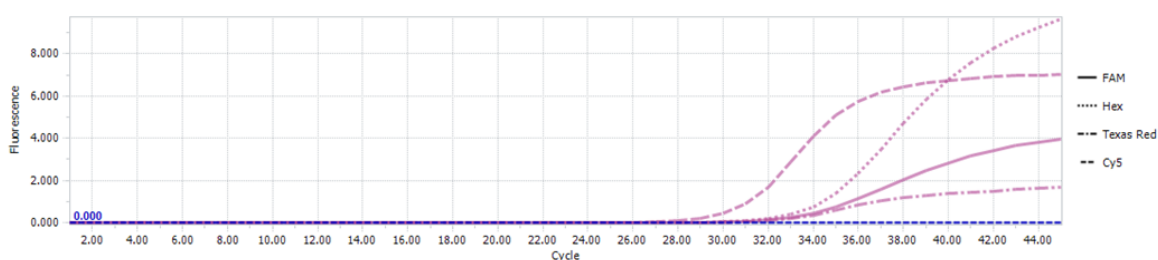
Jedná se o polymerázovou řetězovou reakci, kterou je možné pomocí detekčního systému sledovat „v reálném čase“ (odtud pochází i anglické označení Real-Time). Tato metoda je schopna detekovat cílově amplifikovanou DNA buď za využití fluorescenčního substrátu či fluorescenčně značených sond. Tyto sondy/substráty zaručují tvorbu hybridomů. Během jednoho amplifikačního cyklu tedy dochází k emisi fluorescenčního signálu, který je detekován pomocí detekčního systému a za využití softwarového vybavení převeden do tzv. amplifikačního grafu. Amplifikační graf tedy vypovídá o vytváření hybridomů, a tedy i jejich počtu. [4, 16]

Jedním z nejčastějších fluorescenčních substrátů, které se používají pro tuto metodu je například SYBR Green I, LC Green a další. Tento typ substrátu je nespecificky vázán k úsekům dsDNA. Dále jsou běžně používány fluorescenční sondy, jako jsou TaqMan, Molecular Beacon či speciální hybridizační sondy FRET (Försterův rezonanční přenos energie). Tyto fluorescenční sondy jsou synteticky připravené oligonukleotidy, které mají na jednom konci navázanou fluorescenční značku a na konci druhém zhášec. Dokud je sonda neaktivní, je její fluorescenční schopnost zhášena a nevzniká žádný signál. Ovšem během amplifikace, kdy dojde k rozpoznání cílové sekvence, sonda nasedá na vznikající řetězec a vlivem pracování DNA-polymerázy dochází k jejímu štěpení, což způsobí emisi fluorescenčního signálu. Během jednotlivých cyklů amplifikace je emise signálu stále větší. Vznikající fluorescence vypovídá o množství vytvořených kopií. [4]

Výhodou fluorogenních sond je jejich specifická hybridizace mezi samotnou sondou a cílovou sekvencí DNA, což má význam pro vytváření fluorescenčního signálu. Dále se mohou používat sondy, které jsou označeny různými druhy fluorescenčních barviv,

což je využíváno k rozlišení amplifikace dvou a více různých sekvencí v jedné PCR reakci (např. multiplexová RT-PCR). [4]

Amplifikační graf je tedy znázornění fluorescenčního signálu probíhajících cyklů. Když je PCR zahájena, tak v počátečních cyklech dochází k minimálním změnám intenzity fluorescence, tyto počáteční cykly tedy vytvářejí základní linii amplifikace. Pokud dojde k zvýšení signálu nad tuto základní linii, znamená to, že dochází k nahromadění hledaného produktu – tedy amplikonu. Tento bod se označuje jako Ct (tzv. prahový cyklus, označení vyplývá z anglického označení *Threshold Cycle*). [4, 16] Na **Obrázku 5** je znázorněna ukázka amplifikačního grafu.



Obrázek 5 Amplifikační graf

Zdroj: Ústav mikrobiologie – Oddělení virologie, sérologie a parazitologie, FN Plzeň [13.2.2023]

3.3 Ostatní modifikace PCR

3.3.1 Reverse Transcription PCR

Reverse Transcription PCR nebo také zpětná PCR je metoda určená k amplifikaci RNA. Za standardních podmínek lze PCR metodou amplifikovat pouze DNA. Proto je nezbytné RNA nejprve převést do její tzv. komplementární DNA (cDNA). K tomuto přepisu NK je zapotřebí enzymu – reverzní transkriptázy. V mikrobiologických laboratořích máme na výběr například z M-MuLV (reverzní transkriptáza z Moloneyho myšího leukemického viru), AMV (reverzní transkriptáza z ptačího megaloblastického viru) nebo asi nejužívanější tzv. rTth (termostabilní reverzní transkriptáza izolovaná z bakterií *Thermus thermophilus*). Dále je k zahájení syntézy vlákna cDNA potřeba oligonukleotidového primeru, který nasedá na templátovou RNA. Po přepisu je možné již amplifikovat vzorek pomocí standardního postupu PCR. Metoda našla své uplatnění například ve virologii, pro průkaz nejrozličnějších virů, které obsahují pouze RNA, jako jsou HIV, HCV, rubivirus, virus chřipky, klíšťové encefalidity a další. [3, 4, 16, 20, 22]

3.3.2 Nested PCR

Tato modifikace je založena na re-amplifikaci prvotního produktu PCR reakce. Při této modifikaci je tedy potřeba použít dva páry primerů, jeden pár do první reakce, druhý pár do reakce druhé, kdy platí, že použité primery musí být odlišné. Jedna reakce trvá přibližně 15 až 30 cyklů. Tyto primery jsou navrženy tak, aby specificky hybridizovaly s vnitřními sekvencemi, které jsou přítomny ve vytvořených amplikonech prvotní PCR reakce. Výhody pramenící z této metodiky jsou vyšší specifita a citlivost testu. Naneštěstí jedna z největších nevýhod této metody je zvýšené riziko kontaminace v důsledku většího množství amplifikačních produktů a kroků v pracovním postupu reakce. [23, 24]

3.3.3 Hot-start PCR

Přestože je PCR velmi citlivá metoda mohou nastat komplikace jako např. tvorba primer-dimeru nebo může dojít ke špatnému nasednutí primeru, což je způsobeno nesespecifickou vazbou s cílovou DNA. Bylo zjištěno, že nesespecifické amplikony vznikají za nižší teploty ještě před začátkem první denaturační fáze, a to vlivem širokého teplotního rozmezí DNA polymerázy. Tyto nesespecifické produkty, poté co dosáhne cykler požadované teploty a probíhá již PCR reakce a tvoří se již i správně amplifikované produkty, soutěží s nesespecifickými produkty o reagencie potřebné pro proběhnutí reakce. Hot-start metoda byla navržena tak, aby zamezila tvorbě nesespecifických amplikonů. Hlavním cílem je blokovat aktivitu DNA polymerázy při nižších teplotách do té doby, dokud cykler nedosáhne teplotní podmínky – počáteční denuraci. [25]

Během vývoje této metody bylo vyvinuto několik postupů, jak proces zlepšit. Jednou z technik bylo zavedení bariér – voskové bariéry oddělují klíčové komponenty pro průběh reakce do dosažení zvýšené teploty – tedy prvotní denurace. Další bariérou je zapouzdřená DNA polymeráza ve vosku, ten se rozpustí při dosažení startovací podmínky – počáteční denurace, poslední z bariér je možnost využít tzv. mikrofluidního zařízení, které vytváří bariéru uvnitř reakce. Další možností je řízené přidávání hořčíku do reakce nebo použití hořčíkovou sraženinu, poté co dosáhne cykler požadované teploty dojde k jejímu rozpuštění. Nejnovější technologie byly vyvinuty tak, aby blokovaly aktivitu DNA polymerázy za využití protilátek tzv. aptamerů. To jsou oligonukleotidové molekuly, které se vážou na DNA polymerázu při nižších teplotách a následně se uvolní při zvýšených teplotách. [25]

3.3.4 Asymetrická PCR

Při tomto typu PCR reakce, je vždy přítomen jeden primer ve vyšší koncentraci, než druhý primer (nejčastěji v rozpětí koncentrací v poměru 1:50 až do 1:100). Což umožňuje vytěžit z reakce vysokou koncentraci molekul jednovláknové DNA o délce až 1000 bp. [24]

Během prvních 15-20 cyklů je DNA amplifikována, což je množství kopií jako při běžné PCR reakci, avšak v důsledku nižší koncentrace jednoho z primerů, dojde k jeho vyčerpání a tím i k „selhání“ exponenciálního přírůstku amplikonů. V tomto okamžiku tím, že v reakci zůstává stále jeden primer, během následujících 30–40 cyklech dochází k tvorbě jednovláknových amplikonů. Z tohoto principu se dá soudit, že asymetrická PCR má dvoufázový proces. V prvním kroku dochází k exponenciální amplifikaci a ve fázi druhé k lineárnímu zesílení. Pokud by bylo potřeba pro některé další metody oddělení jednovláknových DNA produktů od dvouvláknových, lze využít elektroforézu (nejčastěji na agarózovém gelu). [24]

3.3.5 Izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP)

Genetická testování vyžadují extrakci nukleových kyselin ze vzorků, genovou amplifikaci a detekční systém. Všechny tyto složky vyžadují zručnost, znalosti, a především drahé vybavení. Na tento podnět byl vyvinut nový typ amplifikace, a to metoda LAMP – izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou. Přednosti této metody kombinují jednoduchost s rychlostí a vysokou specifitou. [26]

Tato technika je velmi specifická a dokáže namnožit DNA ze vzorku až na miliardu kopií za méně než jednu hodinu. Tuto metodiku je možné provést i bez pokročilejšího laboratorního vybavení, jako je například blotový ohříváč či vodní lázně. Předností metody je vysoká specifita díky využití několika primerů (většinou od čtyř do šesti), které dokážou rozlišit až osm specifických míst na templátové DNA. Nejdůležitějším prvkem, který je zodpovědný za správný průběh reakce je návrh primerů. Tyto primery musí být optimalizovány z hlediska faktorů, koncentrace, umístění nukleotidových bází a vzdálenosti mezi nimi. Primery musí mít jednovláknovou strukturu při 60-65 °C a nesmí tvořit stabilní dvouvláknovou strukturu DNA. Při metodě LAMP je využíváno vnitřních a vnějších párů primerů, které se kombinují s DNA polymerázou. Smyčkové primery významně zlepšují účinnost a citlivost reakce, a dokáží zkrátit potřebnou dobu až o polovinu. [27]

Metoda LAMP nemá denaturační fázi DNA, protože díky tzv. Bst DNA polymeráze může být reakce prováděna v izotermických podmínkách. Všechny fáze LAMP reakce se provádějí při stabilní teplotě kolem 60-65 °C, což eliminuje potřebu použití termocyklerů k přesně nastavené teplotě a časových profilů, které se běžně užívají při PCR reakcích. LAMP má tři fáze, a to výrobu výchozího materiálu, cyklickou amplifikaci a elongaci kombinovanou s recyklací. [27]

V mikrobiologii může být metoda LAMP použita pro detekci různých mikroorganismů. Dosud bylo touto metodou prokázáno mnoho patogenů způsobující respirační infekce. Jsou to patogeny jako *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* či *Bordetella pertussis* a mnoho dalších. Dále se tato metoda uplatnila v diagnostice gastrointestinálních infekcí, např. patogenů jako *Salmonella Typhi*, *Campylobacter jejuni* a *Helicobacter pylori*. Dále je možné metodu LAMP využít při diagnostice řady virů, například adenovirů, dále pak virů *Varicella zoster*, *Cytomegalovirus* a mnoha dalších. [28]

3.4 Využití PCR reakce pro diagnostiku infekčních onemocnění

Mezi infekční onemocnění se zařazuje jakákoliv nemoc, jejíž původcem je mikroorganismus. Nejčastěji se jedná o bakterie nebo viry. Kromě nich je možno pomocí metody PCR prokazovat také parazity nebo mykotické patogeny. [3]

3.4.1 Využití PCR v klinické bakteriologii

Metody založené na PCR se dříve využívaly především ve výzkumu. Dnes jsou běžně využívány i v klinické praxi pro identifikaci bakteriálních patogenů. V tomto případě je PCR metoda zaměřena zejména na detekci bakterií, které se vyznačují pomalým růstem či růst nemohou, nebo jsou špatně kultivovatelné. V průběhu času byly vytvořeny testy na detekci patogenů jako *Neisseria gonorrhoeae* (původce kapavky), *Mycobacterium tuberculosis* (původce tuberkulózy), *Chlamydia trachomatis* (původce STD onemocnění), dále pak např. pro průkaz bakterií rodu *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* a řady dalších. [2, 29] Dále se mohou vyšetřovat bakteriální původci jako *Borrelia burgdorferi sensu lato* – původce lymeské boreliózy, *Streptococcus agalactiae* – způsobuje mimo jiné těžké meningitidy u novorozenců, *Streptococcus pneumoniae* – způsobuje respirační infekty včetně pneumonií, *Staphylococcus aureus* – způsobuje kožní problémy, záněty prsu, plic atd., *Haemophilus influenzae* – původce infekcí dýchacích cest, nebo *Neisseria meningitidis* – způsobující těžké meningitidy. [3]

3.4.2 Využití PCR v klinické virologii

Pokroky v molekulární biologii umožnily detekovat a charakterizovat také nukleové kyseliny virů. Tato vylepšení vedla k detekci kompletního zmapování virové NK, dále určení genotypu, podtypu, mutací či genotypových rezistencí. Nejčastěji detekované viry touto metodou jsou např. HIV, virus hepatitidy B, lidský cytomegalovirus a herpes simplex virus typu 1 i 2 a řada dalších. [29]

3.4.3 Využití PCR v klinické mykologii

V poslední dekádě došlo také k pokroku molekulární diagnostiky mykotických patogenů. Díky PCR metodě lze detekovat přítomnost těchto patogenů i ze stopového množství ve vzorku, a tím i včas zahájit terapii ještě před úplným rozvinutím nemoci. Metoda se používá např. pro detekci patogenů jako je *Pneumocystis jirovecii*, *Aspergillus* spp. A mnoho dalších. [29]

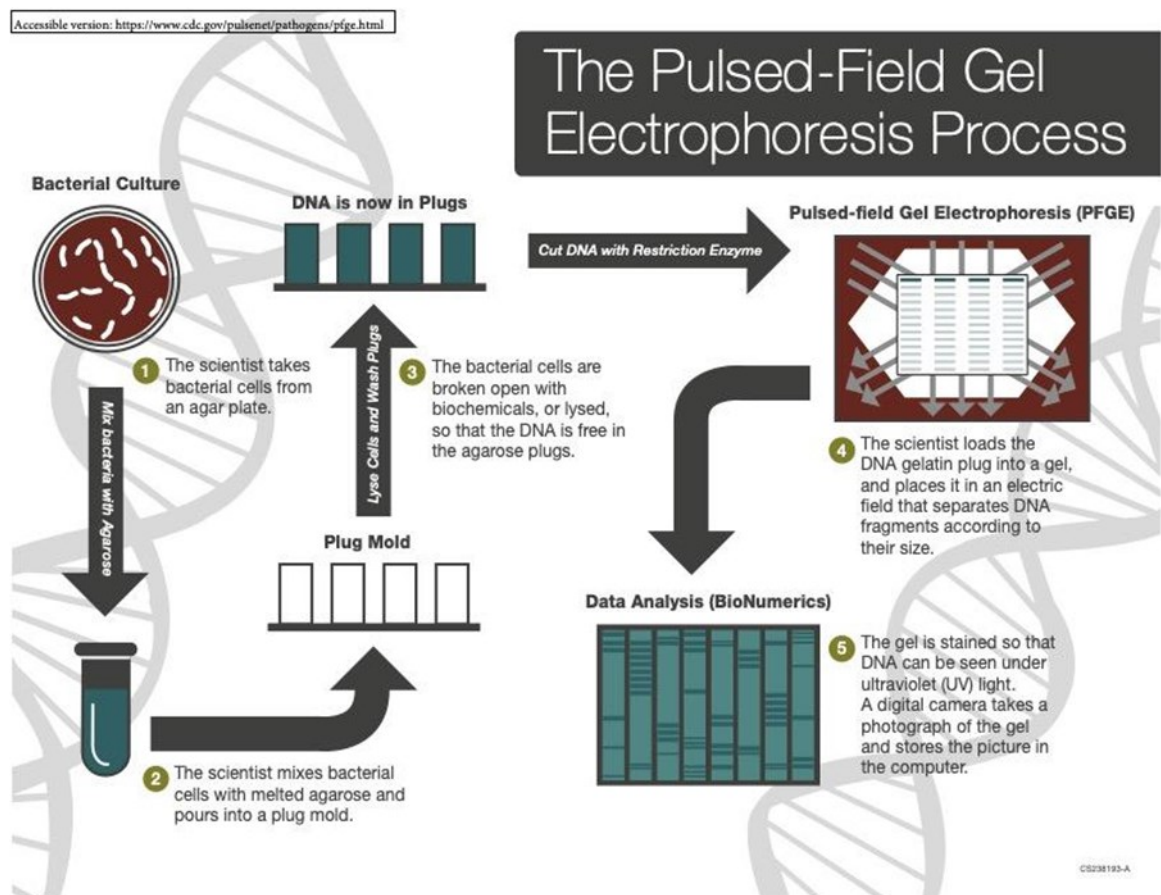
3.4.4 Využití v klinické parazitologii

Většina parazitů nelze kultivovat v laboratorních podmínkách a samotná interpretace závisí na sérologickém průkazu či na méně citlivé mikroskopii. Pomocí PCR je možné detekovat například parazity jako je *Plasmodium* spp. [29]

3.5 Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)

Během využití běžné gelové elektroforézy jsou molekuly DNA v přímočarém a plynulém pohybu od katody k anodě. Rychlost tohoto pohybu je úměrná jejich velikosti a samotná separace je následně podmíněna rychlejším průchodem menších molekul gelem. Takový princip dělení je uplatněn však jen u menších molekul DNA, a to do velikosti přibližně 50 kb. K separaci větších molekul je právě využívána pulzní gelová elektroforéza (PFGE), jelikož během běžné separace by větší molekuly uvízly ve struktuře gelu a nedošlo by k jejich rozdělení. Metoda PFGE přinesla možnost separovat molekuly, které obsahují až 12 milionů páru bazí. [20, 30]

Při využití PFGE je gel vystaven působení dvěma či více elektrickým polím, což způsobuje, že směr je pod úhlem 90-180° periodicky měněn a k tomu dochází v pravidelných časových intervalech (pulzech), což vytváří zig-zag pohyb molekuly. Při zapojení prvního elektrického pole jsou separované molekuly srovnávány do správného směru a dojde k jejich pohybu gelem. Vlivem přerušení prvního pole a zároveň aktivací druhého elektrického pole dochází k nucené změně směru svého původního pohybu. Aby se molekuly DNA mohly v tomto novém směru pohybovat, musí změnit svojí orientaci. U větších molekul je potřeba času k reorientaci více než u menších molekul, proto je pohyb větších molekul mnohem pomalejší. Z toho vyplývá, že čas k přeorientování molekul je tím delší, čím je delší řetězec molekuly DNA, a takto jsou molekuly v PFGE separovány. Na **Obrázku 6** je přehledně zobrazen princip PFGE. [20, 30, 31, 32, 33]



Obrázek 6 Schéma provedení pulzní gelové elektroforézy

Zdroj: Centers for Disease Control and Prevention, 2016 [online], citováno [13.02.2023].
Dostupné z: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>

Mezi hlavní náležitosti PFGE náležitě patří – pulzní čas, jedná se o proměnlivý parametr, který je možné během samotné separace měnit. Může být buď stálý, nebo je možné

ho zvyšovat. Tímto způsobem je možné regulovat velikost molekul. Pokud je požadováno separovat větší molekuly, je doporučováno delšího pulzního času, naopak pro molekuly menší kratší časy. Dále velikost napětí či čas běhu separace – obdobně jako u pulzního času, v závislosti na velikosti stanovovaných molekul je volen i vhodný čas, dále pak reorientační úhel – rozlišení zón je dán pravidlem, čím je úhel vyšší tím jsou jednotlivé separační zóny ostřejší, teplota – u klasické elektroforézy je využívána běžná laboratorní teplota. Na rozdíl od PFGE, kde je zapotřebí snížené teploty, přibližně okolo 4-15 °C. A v neposlední řadě koncentrace agarózového gelu, kde platí závislost na koncentraci, tedy u vyšší koncentrace agarózy se molekuly pohybují pomaleji, a naopak u menších koncentrací je pohyb molekul rychlejší. [32, 34]

3.5.1 Využití PFGE v mikrobiologii

Pulzní gelová elektroforéza je stále považována za zlatý standard pro mnoho bakterií. Slouží například k typizaci bakterií pro vyšetřování ohnisek a sledování nákazy, což přineslo vysoký význam v oboru epidemiologie a mikrobiologie, dále umožnila epidemiologické studie kvasinek a hub. Některé studie poukazují, že by tato metoda byla nápomocná i k přípravě vakcín, díky možnosti identifikace genů způsobující rezistence na antibiotika. [33, 35, 36, 37, 38]

PFGE se vyznačuje svojí velkou diskriminační silou a reprodukovatelností, díky těmto klíčovým vlastnostem se stala široce využívanou metodou pro srovnávání typizací téměř všech bakteriálních druhů, jako jsou například grampozitivní bakterie (stafylokoky, enterokoky, mykobakterie, a další), také gramnegativní bakterie (*Escherichia coli*, *Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp., a další). [36, 37, 39] Přestože se metoda jeví jako velmi kvalitní, má také i řadu nevýhod, především je to její časová náročnost, která se pohybuje okolo 5-7 dní. Proto je PFGE převážně využívána ve výzkumných laboratořích, které provádějí speciální analýzy vzorků. [33, 38, 39, 40]

3.6 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Tato metoda je založena na štěpení molekul DNA na specifických místech specifickými enzymy – tzv. restrikčními endonukleázami – na fragmenty. Restrikční endonukleázy jsou enzymy bakteriálního původu. Zprvu byly zaměřené na ochranu před cizorodou DNA, dnes se již hojně využívají v genetickém testování pro charakterizaci DNA. Dodnes bylo popsáno velké množství těchto endonukleáz (přibližně 1500), které se od sebe liší pouze v rozpoznávání různých krátkých nukleotidových sekvencí. [7]

Všechny typy restričních endonukleáz štěpí cílovou DNA na různých místech na základě sekvence DNA. Rozdíly ve velikosti vzniklých fragmentů lze jednoduše detekovat za využití pulzní gelové elektroforézy. Gelová elektroforéza umožňuje jejich separaci na základě délky a množství fragmentů, a následnou detekci rozdílů v sekvencích tzv. polymorfismus. Tyto polymorfismy jsou způsobeny přestavbami v genetickém kódu na základě přítomnosti nebo chybění inicializačních míst a štěpných úseků (např. delece, inserce, inverze, ...). Elektroforéza může být doplněna další metodou jako je hybridizace typu Southern blot. Výběr různých typů hybridizace umožňuje jednodušší interpretaci výsledků při analýze RFLP, vlivem snížení počtu některých fragmentů. [7, 20, 41] Tato metoda je poměrně časově náročná, má vyšší pořizovací náklady a v neposlední řadě vyžaduje větší množství DNA. [41]

3.6.1 Využití RFLP v mikrobiologii

RFLP analýza je jednou z prvních používaných metod k typizaci bakterií. Metoda nám poskytuje informaci o genetické různorodosti mezi kmeny různých skupin organismů. Tedy obecně je metoda využívána k epidemiologickým účelům, ať už k sledování zdroje nákazy či rezistentního dohledu nad infekcemi. RFLP je často spojována s dalšími metodami, jako jsou PFGE, PCR, Southern blotování a další, a poskytují tak lepší výsledky. Díky tomu mohlo být prostudováno spousta mikroorganismů, například bylo možné rozlišit různé genotypy *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus* a dalších. [35, 42, 43]

3.7 Hybridizace

Hybridizace má v molekulární biologii široké pole působnosti, nejen že dokáže zachytit chromozomové aberace či mutace u genetických chorob, ale také slouží k diagnostice některých virových onemocnění. [3] Hybridizační techniky jsou založeny na schopnosti dvou řetězců nukleových kyselin vytvářet dvouvláknové molekuly – hybridy. To ovšem za předpokladu, že vlákna mají komplementární sekvenci bází. Metody hybridizace vyžadují vždy přítomnost alespoň jednoho známého řetězce nukleové kyseliny, aby bylo možné identifikovat druhý neznámý řetězec. [3, 4, 14]

Na základě charakteru materiálu je možné rozdělit dva základní typy hybridizačních metod, a to molekulární hybridizaci a hybridizaci in situ. Molekulární hybridizace vychází ze skutečnosti, že nukleová kyselina byla extrahována z biologického materiálu.

U hybridizací in situ je nukleová kyselina v biologickém materiálu přítomna v podobě například celých buněk nebo i celých chromozomů. [3]

Pro hybridizační techniku jsou důležité tyto kroky (I) výroba a značení jednořetězcových hybridizačních sond, (II) příprava cílové jednovláknové nukleové kyseliny a (III) smíchání a následná hybridizace cílové nukleové kyseliny a sondy. [3, 4]

(I) Tyto sondy jsou ve své podstatě krátké nukleové kyseliny značené známými sekvencemi nukleotidů, které jsou navrženy tak, aby specificky hybridizovaly s cílovou nukleovou kyselinou. Jednou z možností označení těchto sekvencí nukleotidů je za pomoci radioaktivních značek. Používanými radioaktivními izotopy jsou např. ^{32}P , ^{35}S , nebo ^{125}I . Přestože toto značení poskytuje nejvyšší citlivost, má řadu nevýhod (např. vyšší pořizovací náklady, krátká životnost izotopu, obtížná manipulace a skladování včetně likvidace a v neposlední řadě radioaktivní izotopy jsou zdraví škodlivé). Časem došlo k inovaci a postupně se dává přednost neradioaktivnímu značení, a to chemickému. Jako chemické značky se používají například biotin, digoxigenin nebo akridinium ester. Každá molekula biotinu se vždy váže na čtyři molekuly avidinu, používají se tzv. biotinylované sondy, které specificky hybridizují s cílovou sekvencí a tyto sondy je možné detekovat pomocí avidinu nebo streptavidinu, který je značen enzymem (např. peroxidáza, luciferáza, ...). Po přidání substrátu do reakce dojde v případě pozitivní reakce k produkci barevného produktu. Jiné techniky mohou využívat i avidin nebo protilátku značenou fluorescenčním barvivem (např. fluorescein, rhodamin, ...). Proběhlá hybridizace je poté kontrolována v oblasti ultrafialového záření. [3, 4, 14]

(II) Vstupním materiálem pro nukleovou kyselinu jsou mikroorganismy pocházející buď z patientského vzorku, nebo z již narostlé kultury. Samotná separace této nukleové kyseliny může probíhat buď chemickými technikami, popřípadě enzymatickými (viz kapitola Izolace DNA). Hlavním cílem je včas zpracovat nukleovou kyselinu, aby byla zaručena její stabilizace a byla zároveň zachována její struktura. Zachování těchto dvou vlastností je nezbytné pro následnou denaturaci, a rozvolnění kyseliny na jednotlivé řetězce. [3, 4, 14]

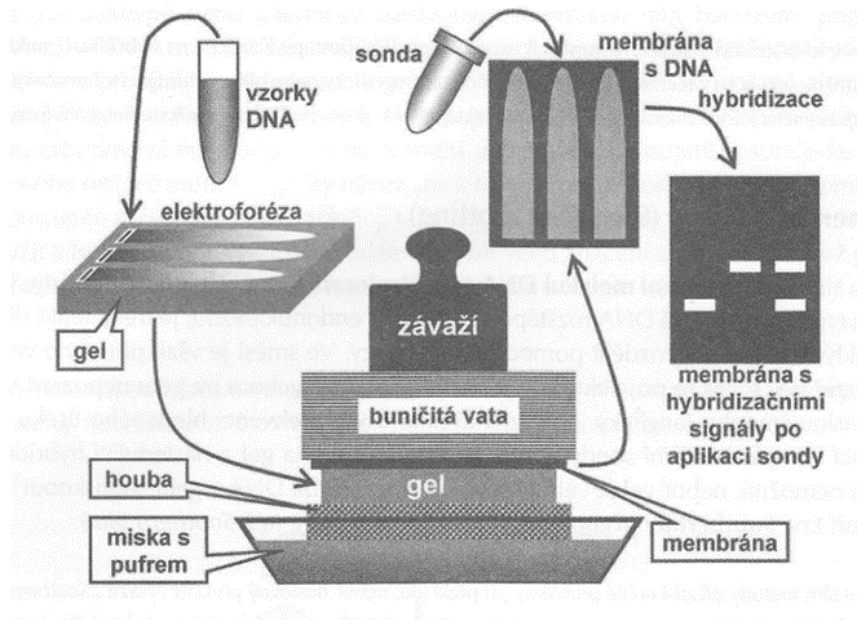
(III) Aby došlo k nasednutí sondy na cílovou nukleovou kyselinu, je nutné zajistit optimální teplotní podmínky a dostatečnou koncentraci iontů – tomuto jevu se říká hybridizace. Čím jsou tyto podmínky přísnější, tím dochází k lepšímu nasednutí sond na vyšetřovanou nukleovou kyselinu a tím jsou i stabilnější produkty. Pokud je teplota

kolísavá může docházet ke vzniku nestabilních hybridů, které mají nedokonale spárované báze. Vznikající produkty jsou komplexy RNA-RNA (nejstabilnější), RNA-DNA (méně stabilní), DNA-DNA. (nejméně stabilní). [3, 4, 14]

Dalším možným rozdělením hybridizace je na základě provedení, které může být buď ve vodní fázi, nebo v pevné fázi. Principem hybridizace ve vodní fázi je, že nukleové kyseliny jsou schopny spolu volně interagovat ve vodném prostředí. Výhodou tohoto prostředí je vyšší rychlost hybridizace. Cílová DNA je denaturována za vzniku jednovláknové DNA, která je následně smíchána s jednořetězcovými sondami a dochází k tvorbě hybridů. K provedení této metody stačí i jen malé množství vzorku. U hybridizace v pevné fázi probíhá samotná hybridizace na pevném nosiči (např. nitrocelulózová nebo nylonová membrána). Dodnes byly popsány čtyři způsoby provedení hybridizace v pevné fázi – dot/slot, sendvičová hybridizace, Southern blot a in situ hybridizace. [3, 4, 14]

3.7.1 Southern blotting (Southernův přenos)

Tato technika je vyhrazena na přenos a hybridizaci DNA. Když je DNA extrahována ze vzorku a očištěna je možné rozdělit jí do několika frakcí podle různých velikostí za pomoci restrikčních enzymů. Tyto frakce jsou následně separovány na gelu pomocí elektroforézy v závislosti na jejich molekulové hmotnosti a velikosti použitého elektrického pole. Kratší fragment putují rychleji a do větší vzdálenosti v gelu než větší fragmenty. Poté je cílová DNA přenesena na membránu, běžně používanými jsou nitrocelulózová, popřípadě nylonová (může být vyrobena z nenabitého nylonu nebo pozitivně nabitého nylonu). Membrána je poté ponořena do hybridizační tekutiny obsahující sondy. Hybridizační tekutiny jsou využívány, protože nelze aplikovat sondy přímo na elektroforetický gel z důvodu jeho křehkosti. K zajištění snížení nespecifických vazeb sond na DNA jsou používány detergenty (např. SDS) a deionizovaný formamid. Metoda umožňuje určit specifický fragment nukleové kyseliny, který nese požadovanou sekvenci bází. [4, 44] Na **Obrázku 7** je zobrazeno schéma základního principu Southern blottingu.



Obrázek 7 Schéma provedení Southern blottingu

Zdroj: KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007*

3.7.2 Northern blotting

Jedná se o obdobu Southern blotové techniky, s tím rozdílem, že při této metodě je hybridizovaná RNA, tu je nejprve potřeba ze směsi nukleových kyselin izolovat. [4, 8]

3.7.3 Western blotting

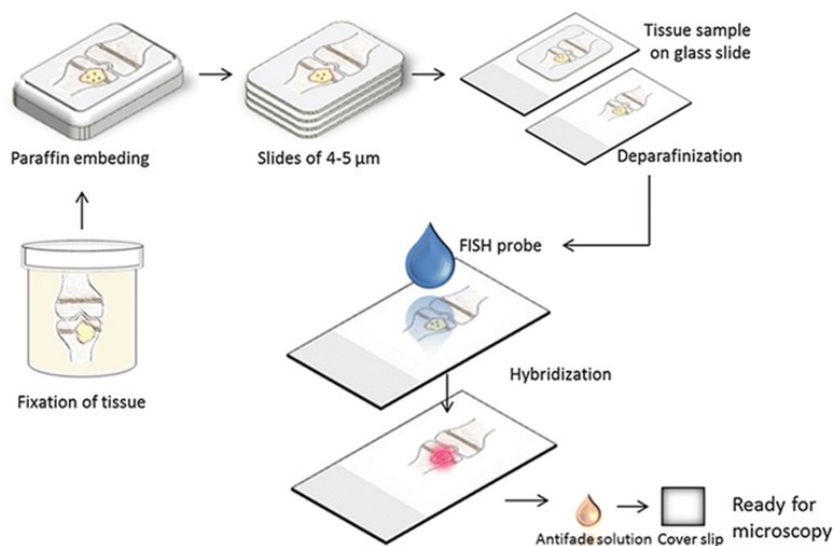
Western blot též známý jako immunoblot byl vyvinut z technik Southern a Northern blotu. Tato technika umožňuje přenos proteinů z elektroforetického gelu (nejčastěji polyakrylamidového) na absorpční membránu. Následně jsou použity sondy obsahující protilátku namířenou proti příslušným proteinům navázaných na membráně. [45]

3.7.4 Sendvičová hybridizace

Při této hybridizaci je využíváno dvou sond – jedné neoznačené, která je nejčastěji navázaná na dně mikrotitrační destičky a slouží k zachycení cílové DNA ze vzorku. Vytvoření tohoto komplexu je poté detekováno pomocí druhé sondy, která je specifická pro jinou část cílové sekvence. Výhodou této hybridizace je snížená nespecifická reakce vlivem komplexu sonda-cílová sekvence-sonda a vyšší specifita reakce. Naopak nevýhodou je náročnost práce, je zde větší počet pracovních kroků a nutné promývání. [4]

3.7.5 In situ hybridizace

Tato hybridizace je založena na detekci přítomnosti specifických sekvencí nukleových kyselin přímo ve vyšetřované tkáni či na buněčných strukturách bez nutnosti izolace DNA. Na mikroskopickém sklíčku je uchycena tkáň a působí tak jako pevná fáze. Tkáňové vzorky jsou zpracovány tak, aby byla co nejvíce zachována struktura tkáně, ale i přesto bylo možné uvolnit nukleovou kyselinu patogenu pro následnou denaturaci a vzniku jednovláknové nukleové kyseliny s neporušenou sekvencí bází. Nejběžněji používané sondy jsou fluorescenčně značené – Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), pro detekci u této modifikace je potřeba fluorescenčního mikroskopu. Během této techniky je možné použít různé sekvenční sondy značené různými barvami, což umožní identifikovat polohu několika genů najednou. Znázornění hybridizačního signálu v případě FISH je v podobě svítícího bodu v tmavém pozadí fluorescenčního mikroskopu. Výhody této metody spočívají v přesné detekci infikovaných buněk ve tkáni, dále je užitečná pro detekci intracelulárních parazitů, dále je možné pomocí in situ hybridizace detekovat virovou DNA, popřípadě RNA. V neposlední řadě je možné provádět hybridizace při současném histologickém pozorování. [3, 4, 8, 10, 14] Na následujícím **Obrázku 8** je znázorněno jednoduché schéma provedení FISH.



Obrázek 8 Schéma FISH

Zdroj: *Veterian Key*, 2017 [online], citováno [13.2.2023]. Dostupné z: <https://veteriankey.com/fluorescence-in-situ-hybridization-for-the-tissue-detection-of-bacterial-pathogens-associated-with-porcine-infections/>

3.7.6 Využití hybridizačních technik v klinické mikrobiologii

Hybridizační techniky jsou již delší dobou hojně využívány pro účely detekce v oblasti genetiky – pro diagnostiku dědičných chorob, ale jsou používány i v mikrobiologii – pro diagnostiku infekčních chorob. Tyto techniky přispívají k vyloučení či prokázání infekčního agens ve vzorcích tkání i tělních tekutin. Mohou to být patogeny jako například *Chlamydia pneumoniae*, *Human papillomavirus*, *Epstein-Barr virus*, *Cytomegalovirus*, *Mycobacterium tuberculosis* a mnoho dalších. [46, 47]

3.8 Sekvence DNA

Sekvenační techniky patří mezi modernější molekulárně-genetické metody. Sekvenování je založeno na principu stanovení primární struktury DNA, tzn. stanovení přesného pořadí nukleotidů (A – adeninu, C – cytosinu, T – thyminu, G – guaninu). Znalost pořadí nukleotidů poukazuje na informace o pořadí aminokyselin, které kódují proteiny, jejich regulaci syntézy a v neposlední řadě umožňuje detailnější analýzu mutací, které způsobují například genetické choroby, nebo v případě bakterií kódují geny rezistence. Dále v klinických laboratořích jsou tyto metody využívány k typizaci mikroorganismů a identifikace haplotypů a polymorfismů, a to již od známých sekvencí, tím je umožněno odhalovat různé substituce, delece, inserce či duplikace v genomech. Sekvenovat je možné buď určitý úsek DNA, nebo celý genom. Touto metodou lze i stanovit nepřímo i RNA, která je převedena pomocí reverzní transkripce na DNA. Dnes jsou v praxi převážně využívány dvě metody, a to Sangerova sekvenace (starší metoda) a novější, celogenomové sekvenování (WGS). [3, 8, 10, 20]

Historie sekvenování DNA

Počátky sekvenování se objevily již na konci 70. let 20. století, kdy byly uvedeny dvě základní sekvenační metody. První metoda vyvinuta ve Velké Británii Frederickem Sangerem ve spolupráci s jeho kolegy, označována jako Sangerova sekvenace. Druhá metoda byla vyvinuta v USA Allanem Maxamem a Walterem Gilbertem, označovaná jako tzv. Maxam-Gilbertova sekvenace. Přestože jsou obě tyto metody principiálně odlišné, obě umožňují v poměrně krátkém časovém úseku určit sekvence DNA. Naopak společným požadavkem pro obě metody je výchozí materiál (například fragmenty DNA získané z PCR reakcí). Od Maxam-Gilbertovy techniky se ustoupilo z důvodu potřeby reagentů, které byly toxické a představovaly zdravotní riziko pro pracovníky. Jedním z dalších důvodů, proč je dodnes používáno sekvenování dle Sangera je relativní jednoduchost této techniky

a možnost využít přístroje tzv. sekvenátory, které Sangerovo sekvenování automatizují. [10, 20, 48]

Sekvenační techniky je možné rozdělit na základě postupného vývoje do několika generací, kdy Sangerovo sekvenování a pyrosekvenování jsou označovány jako sekvenování první generace. Do druhé generace řadíme metody jako jsou Ion Torrent, Roche 454 a další, a do poslední skupiny neboli třetí generace sekvenování – někdy také sekvenování nové generace (NGS), patří platforma Illumina a long-read platformy jako například Pacific Biosystems nebo Nanopore.

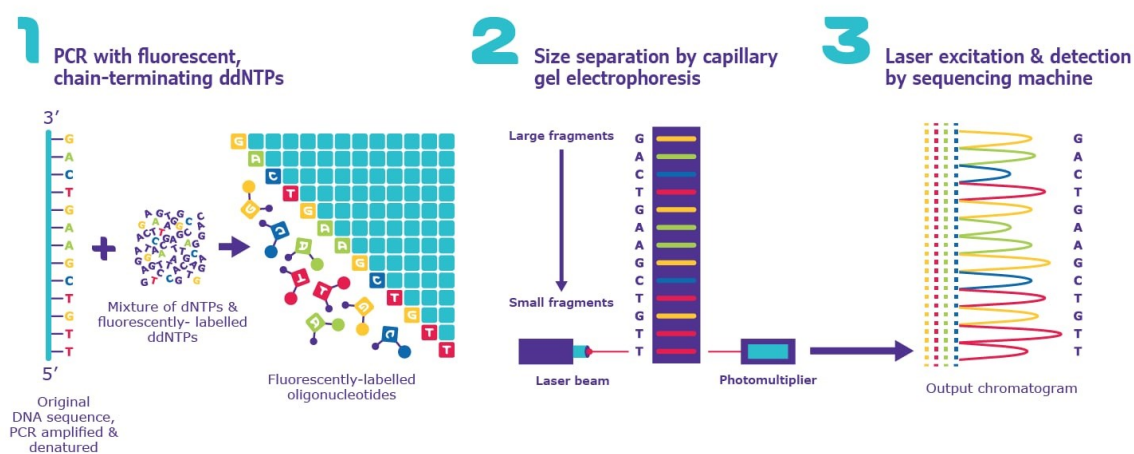
3.8.1 První generace sekvenování

Sangerovo sekvenování

Sekvenování dle Sangera, je technika, který bývá označována také jako enzymatická. V posledních letech se jedná o jednu z nejběžněji používaných metod pro sekvenování krátkých úseků DNA. Tato technika sekvenování využívá jednoho oligonukleotidového primeru. Tento primer je komplementární k počátečnímu úseku námi sekvenované DNA. V samotné reakční směsi je zapotřebí přítomnosti enzymu DNA polymerázy, dále deoxynukleosidtrifosfátů (dNTP) a speciálních dideoxynukleosidtrifosfátů (ddNTP). Tyto speciálně upravené ddNTP jsou uměle připravené jednotlivé nukleosidy (ddATP, ddGTP, ddCTP a ddTTP), které mají na cukerné jednotce svého 3' uhlíkového konce (deoxyribóza) navázán vodík na místo OH skupiny. Dále jsou jednotlivé ddNTP označeny různými fluorescenčními barvami (běžně používanými jsou například JOE, TAMRA, ROX atd.). [3, 20, 48, 49]

Prvotním krokem procesu sekvenace zkoumaného úseku DNA je provedení klasické PCR reakce za využití specifických primerů pro daný úsek. Po navázání primeru dochází k syntéze nových řetězců, do nichž se začleňují jednotlivé nukleotidy obsažené ve směsi. V místech, kde došlo k navázání dNTP pokračuje syntéza dále, dokud nedojde k začlenění fluorescenčně značeného ddNTP, což zastaví syntézu řetězce vlivem chybění OH skupiny na 3' konci. Během reakce je vytvořen velký počet jednotlivých řetězců DNA s různou délkou. Proto je následně nutné využití elektroforetické separace, čímž dojde k získání spektra různě dlouhých úseků DNA. Díky fluorescenčnímu značení ddNTP na konci každého fragmentu dochází k určení sekvence analyzovaného řetězce DNA. Nověji je do praxe zařazena automatická kapilární elektroforéza, kdy dochází k separaci

dle velikosti fragmentů a díky laserové excitaci k následné detekci emitovaného fluorescenčního záření a za využití počítačového softwaru jsou tyto signály převedeny do tzv. sekvenogramu v podobě po sobě jdoucích barevných píků. Princip Sangerova sekvenování je stručně znázorněn na **Obrázku 9**. [3, 20, 48, 49]



Obrázek 9 Princip Sangerova sekvenování

Zdroj: Merck, Sigma-Aldrich Brand [online], citováno [13.2.2023]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>

Pyrosekvenování

Pyrosekvenování bylo poprvé na veřejnost uvedeno v roce 1987 skupinou vědců – Palem Nyrenem Bertilem Petterssonem a Mathiasem Uhlenem. Ti vyslovili myšlenku, že metoda je založena na principu vyzařování světelného signálu, přesněji bioluminiscence. Tato luminiscence vzniká v důsledku začleňování nukleotidů v procesu syntézy DNA řetězce. Během této metody sekvenování není nutnost využití fluorescenčního barviva či fluorescenčně značených ddNTP jako u Sangerova sekvenování. Reakční směs obsahuje čtyři základní enzymy, kterými jsou Klenowův fragment z DNA polymerázy, ATP surfurylázu, luciferázu a apyrázu. Dále obsahuje zkoumanou jednovláčkovou DNA a substráty, kterými jsou adenosin-5'-fosfosulfurát (APS) a luciferin. V neposlední řadě je nutnost přidat jeden ze základních čtyř nukleotidů. Během začleňování příslušného nukleotidu je uvolňován pyrofosfát – odtud název pyrosekvenování, který v přítomnosti enzymů v reakční směsi vytváří bioluminiscenční signál, který lze detekovat pomocí vhodného detekčního systému. [8, 50, 51]

3.8.2 Sekvenování druhé generace

Od roku 2005 došlo k postupnému vzniku nové generace sekvenování, která měla vyřešit jisté problémy či omezení z původní generace. Cílem bylo zejména zrychlení sekvenačního procesu, snížení celkových nákladů, a hlavně možnost interpretovat výsledek bez nutnosti využití elektroforézy. Byly zavedeny platformy jako Roche 454, Ion Torrent, ABI/SOLid a další. [52]

Roche 454

Tato metoda byla zavedena na trh v roce 2005 firmou Roche. Metoda je založena na principu pyrosekvenování, tedy na detekci uvolněného pyrofosfátu. Na začátku musí být templátová DNA fragmentována a následně zachycena na mikrokuličku pomocí tzv. emulzní polymerázové řetězové reakce. Takto připravené kuličky jsou následně vloženy do speciální pikotitrační destičky s jamkami. Do každé jamky je vložena vždy jedna mikrokulička. Následně je do každé jamky přidána další kulička obsahující enzymy nezbytné pro sekvenování. Těmito enzymy jsou DNA-polymeráza, luciferáza, sulfuryláza a další. Pikotitrační destička je následně zaplavena stavebními nukleotidy. Tím se spustí reakce s uvolňováním pyrofosfátu, během začleňování jednotlivých nukleotidů. Pomocí speciálního detekčního systému je následně detekován signál, který vypovídá o počtu a typu začleněných nukleotidů. [52, 53, 54]

Ion Torrent

V roce 2010 firma Life Technologies přinesla na trh novou metodou zvanou Ion Torrent. Jedná se o metodu podobnou výše zmíněné Roche 454, s rozdílem že metoda Ion Torrent nevyužívá žádných fluorescenčně značených nukleotidů. Metoda funguje na principu detekce uvolňování vodíkových iontů během procesu sekvenace. Tato technologie využívá polovodičových čipů, které obsahují na svém povrchu mikrojamky, ve kterých jsou mikrokuličky s navázanými fragmenty DNA. Během začleňování nukleotidů na kuličku dojde k uvolnění vodíkového iontu, tím dochází k změnám pH okolního roztoku. Tato změna pH je detekována pomocí detekčního systému, který je připojen ke dnu mikrojamky a naměřený signál je převeden na napětí. Hodnota tohoto napětí je poté úměrná počtu začleněných nukleotidů. [52, 53]

3.8.3 Sekvenování třetí generace (Sekvenování nové generace – NGS)

Třetí generace je založena na paralelním procesu sekvenování s vysokou diskriminační hodnotou, při kterém je sekvenováno současně tisíce až miliony sekvencí. NGS našla uplatnění hned v několika klinických oborech. V mikrobiologii se například zasloužila o diferenciaci různých kmenů mikroorganismů včetně možnosti detekce náročně kultivovatelných organismů. Třetí generace se především zasloužila o snížení nákladů pro sekvenování, dále byla snížena náročnost přípravy vzorků pro samotnou analýzu a v neposlední řadě bez nutnosti využití PCR amplifikace. [49, 50, 52, 55, 56]

Illumina

Tato metoda byla vyvinuta firmou Solexa, která byla v pozdějších letech odkoupena firmou Illumina. Princip metody spočívá v sekvenaci syntézou řetězců DNA. Samotnou sekvenaci předchází nutnost nafragmentování vyšetřované DNA, ke které jsou následně pomocí enzymů přichyceny tzv. adaptérové sekvence. Poté jsou takto označené fragmenty amplifikovány pomocí můstkové PCR reakce. Během tohoto kroku dochází k ohybu fragmentů, a vznikají tzv. můstky. Poté následuje samotné sekvenování, a to za využití tzv. reverzibilních terminátorů, ve kterých jsou fluorescenčním barvivem značené nukleotidy, dále primery a DNA polymeráza. V posledním kroku jsou fluorescenčně značené nasyntetizované fragmenty pomocí laserového systému excitovány čímž vzniká světelný signál, který je originální pro jednotlivé typy nukleotidů. Pomocí detekčního systému jsou tyto signály převedeny do nukleotidové sekvence. [52, 54, 57]

Pacific Biosystems (PacBio)

V procesu modernizace vznikla nová metoda od americké společnosti Pacific Biosciences, která přinesla novou perspektivu v sekvenačních technikách. Principem této patentované technologie je jednomolekulární sekvenování v reálném čase tzv. SMRT (z anglického názvu *Single-Molecule Real-Time Sequencing*). Samotná analýza spočívá v přidání vyšetřované DNA do jamek (jeden úsek DNA na jednu jamku), ve kterých je navázán enzym – DNA polymeráza. Při následné syntéze řetězce se používají čtyři fluorescenčně značené nukleotidy, které během začleňování do řetězce uvolňují fluorescenční barvivo a emitují světelný signál. Tento signál je za pomoci detekčního systému detekován. [53, 57, 58]

3.8.4 Využití sekvenování v mikrobiologii

Hlavním úkolem všech mikrobiologických laboratoří je rychlá, účinná, ale především přesná identifikace mikroorganismů. Díky molekulárně-genetickým metodám došlo ještě rychleji k implementaci výsledků. Mezi molekulární metody patří polymerázové řetězové reakce, díky níž jsme schopni identifikovat geny, jako jsou například 16S a 18S. Tyto geny jsou široce využívány pro detekci bakterií a hub, a to ve spojení technik PCR se sekvenáčními metodami. Nejčastěji pro tuto diagnostiku je využíváno Sangerovo sekvenování. [59]

Sangerovo sekvenování je doporučováno díky relativně nízkým nákladům, ale i poměrně rychlému provedení. Určení samotného mikroorganismu v co nejkratším možném čase je velmi klíčové pro pacienty s vysoce rizikovými faktory, což se týče bakteriálních nebo mykotických infekcí. Sekvenování genu 16S je zejména výhodné pro diagnostiku neobvyklých bakterií, které jsou obtížně kultivovatelné. Díky tomuto specifickému genu je možné identifikovat bakterie na úrovni bakteriálních rodů a případně i v rámci druhů. Naopak sekvenování genu 18S je využíváno pro diagnostiku hub. [59, 60]

Velké uplatnění sekvenací přinesla metoda WGS především pro epidemiologii, ať pro kontrolu laboratorní křížové kontaminace nebo pro zkoumání přenosových cest patogenů, tak i pro vyšetřování ohnisek epidemií. Při dostatečně reprezentativním vzorku je možné až zrekonstruovat přenosové cesty například mezi zdravotnickými zařízeními, nemocničními odděleními a v některých případech dokonce cestu patogenu z pacienta na pacienta. Tím se nepochybně WGS projevila jako konečný zdroj informací o patogenech a do budoucna jistě nenahraditelným. [61, 62]

Dále pak mohou být bakteriální genomy použity jako cílové zdroje pro molekulární identifikaci a genotypizaci. Porovnání dat z některých databází mohou poskytnout informace o specifických genotypových znacích – jako jsou markery pro virulenci, antibiotickou rezistenci nebo dokonce metabolické dráhy, které mohou pomoci pro navržení nových a vylepšených kultivačních médií nebo nových antibiotik. Dalším využitím sekvenování je detekce antigenních epitopů, které mohou být následně použity pro sérologická stanovení, vývoj monoklonálních protilátek či dokonce pro vývoj vakcín. [62, 63]

PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

4.1 Hlavní cíl

Cílem této bakalářské práce je aplikovat teoretické poznatky o molekulárně-genetických metodách při laboratorní diagnostice *Chlamydia trachomatis* pomocí metody RT-PCR.

4.2 Dílčí cíle

1. Seznámení se s metodami využívanými pro záchyt *Chlamydia trachomatis* v klinické praxi.
2. Provedení vyšetření *Ch. trachomatis* metodou RT-PCR.
3. Statistické zhodnocení epidemiologických dat *Chlamydia trachomatis* ve FN Plzeň za období 2021-2022.

5 CHLAMYDIA TRACHOMATIS

5.1 Teoretický podklad

Chlamydie jsou zvláštním druhem bakterií. Systematicky je řadíme do čeledi *Chlamydiaceae*, kdy tato čeleď rovněž zahrnuje dva rody, a to rod *Chlamydia* a *Chlamydophila*. Rod *Chlamydia* poté zahrnuje několik druhů, které jsou v převážné míře patogenní pro člověka, jedná se zejména o druhy *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydia suis*. Výjimkou je *Chlamydia muridarum*, která způsobuje pneumonie u myší. Druhým zmíněným rodem je *Chlamydophila*. Představitelé tohoto rodu jsou naopak převážně zoopatogenní, jedná se například o druhy *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis*, nebo *Chlamydophila pecorum*. Opět je zde výjimka, kdy *Chlamydophila psittaci* a *Chlamydophila pneumoniae* mohou vyvolat onemocnění i u lidí. [64, 65]

Zvláštnost těchto bakterií je dána tím, že se jedná o intracelulární bakterie, obdobně jako viry, kdy jsou tedy závislé na hostitelské buňce. Jako většina bakterií jsou schopny makromolekulárních přeměn, dokáží se množit a růst, problém ovšem nastává v energetickém metabolismu. Chlamydie nemají vlastní systém pro tvorbu ATP, proto jsou závislé na hostitelských buňkách, od kterých přebírají energii. Jsou označovány jako tzv. energetičtí parazité. Další zvláštností chlamydií je jejich podobnost s gramnegativními bakteriemi ve stavbě buněčné stěny. Rozdíl je v obsahu kyseliny muramové, kdy chlamydiím tato kyselina schází, a také obsahují větší množství lipidů. [64, 65, 66]

Jedním z nejčastějších sexuálně přenosných agens je právě *Chlamydia trachomatis*. Chlamydiové infekce se ve velké míře projevují řadou onemocnění. *Ch. trachomatis* obecně vyvolává infekce urogenitálního traktu s následnými poruchami plodnosti. Dále je původce trachomu, zánětů spojivek (konjunktivitid), zánětů konečníku (proktitid), zánětů hltanu (faryngitid), artritid a dalších. [65, 67]

Izoláty *Chlamydia trachomatis* je možné rozlišit na několik sérotypů, které způsobují různá onemocnění. Sérotypy A, B a C jsou spojovány právě se vznikem trachomu, sérotypy L1, L2 a L3 jsou zodpovědné za výskyt onemocnění *lymphogranuloma venereum*. Dalšími sérotypy jsou D-K, které jsou nejrozšířenější v sexuálně aktivním období, a způsobují tedy urogenitální a oční infekce. [64, 65, 66]

5.2 Možnosti diagnostiky

Metody využívané pro diagnostiku chlamydií je možné obecně rozdělit na metody přímého a nepřímého průkazu. U přímého průkazu je možné provést kultivaci, která je možná jen na tkáňových půdách, jako je například McCoy půda. Mezi další metody přímého průkazu patří enzyzmoimunoanalýza (ELISA) – detekce rodově specifického antigenu chlamydií, mikroimunofluorescence (MIF) a samotný průkaz DNA pomocí PCR nebo jiných molekulárně-genetických metod. U nepřímého průkazu chlamydií je možné využít metody, které jsou založeny na principu detekce protilátek a zahrnují metody jako jsou komplement-fixační reakce, MIF, western blotting a metody ELISA. [64, 67, 68]

5.3 Diagnostika ve FN Plzeň

Fakultní nemocnice v Plzni nabízí více možností pro diagnostiku infekce způsobenou *Chlamydia trachomatis*. Pro bakalářskou práci byla zvolena metoda RT-PCR na Ústavu mikrobiologie. Praktická část probíhala pod dohledem proškoleného personálu.

Pro RT-PCR diagnostiku *Ch. trachomatis* jsou do FN Plzeň zasílány nejrůznější materiály – zejména se jedná o výtěry z urogenitálního traktu, rekta, nebo oka. Dále je pak možné pro diagnostiku použít vzorky moče, punktáty, likvor či ejakulát. Ve FN Plzeň není diagnostika *Chlamydia trachomatis* prováděna každý den, ale je stanovována dvakrát v týdnu, a to v úterý a ve čtvrtek, po nashromáždění dostatečného množství patientských vzorků. Před samotnou analýzou jsou vzorky uloženy do hluboko mrazicího boxu s teplotou -20 °C. Tímto způsobem jsou uskladněny také diagnostické sety pro zachování stability po celý čas expirační doby, a jsou rozmrazovány až před vlastním použitím.

V den konání praktické části bylo nashromážděno celkem 16 patientských vzorků, materiálově se jednalo o výtěry. Materiály byly z mrazicího boxu vytaženy den předem pro pozvolné rozmrazání. Samotná diagnostická část se poté skládala ze dvou etap – izolace bakteriální DNA a přípravy MasterMixu pro RT-PCR.

Nejprve je nutno izolovat bakteriální DNA – k tomu bylo využito automatického izolátoru **SaMag-12** od společnosti Sacace Biotechnologies (Itálie). Vyšetřované vzorky je nejprve nutné seřadit podle přiřazených laboratorních čísel, dále je nutné provést kontrolu žádanky, co se týče identifikace pacienta a samotného materiálu. Takto překontrolované a seřazené vzorky je nutné zvortexovat, aby se co nejvíce odebraného materiálu uvolnilo z výtěrové štětičky do média, které bude dále zpracováváno. Příprava vzorku probíhá dále

v laminárním boxu za sterilních podmínek. Nejprve jsou připraveny zkumavky Eppendorf o objemu 1,5 ml, dále jsou připraveny zkumavky, které se vkládají do izolátoru SaMag-12. Oba typy zkumavek jsou součástí dodávaného diagnostického setu od výrobce. Do zkumavek Eppendorf je pomocí sterilních pipetek přepipetováno přibližně 1 ml daného materiálu z původní výtěrové zkumavky. Následně je zapotřebí pomocí pipety se špičkami s filtrem přenést ze zkumavky 200 μ l vzorku do izolační zkumavky SaMag.

Od tohoto kroku probíhá izolace již ve stroji. Nejprve je nutné připravit samotný izolátor. V izolátoru jsou na příslušné pozice rozmístěny reakční kazety, které jsou od výrobce komerčně dodány, dále pak stojánek s připravenými vzorky. Následně je možné izolaci naprogramovat. Po inicializaci se v menu otevře programování, pomocí čtečky se načte čárový kód s identifikací izolačního setu, v druhém kroku je načítán čárový kód s informací o objemu vzorku a v posledním kroku se načítá kód s informací, jaké množství DNA má být izolováno. Takto připravený izolátor je možné spustit, kdy přibližně v prvních 2 minutách dochází k jeho nahřátí na požadovanou teplotu, a poté je ihned spuštěna izolace. Samotný proces izolace poté trvá přibližně hodinu.

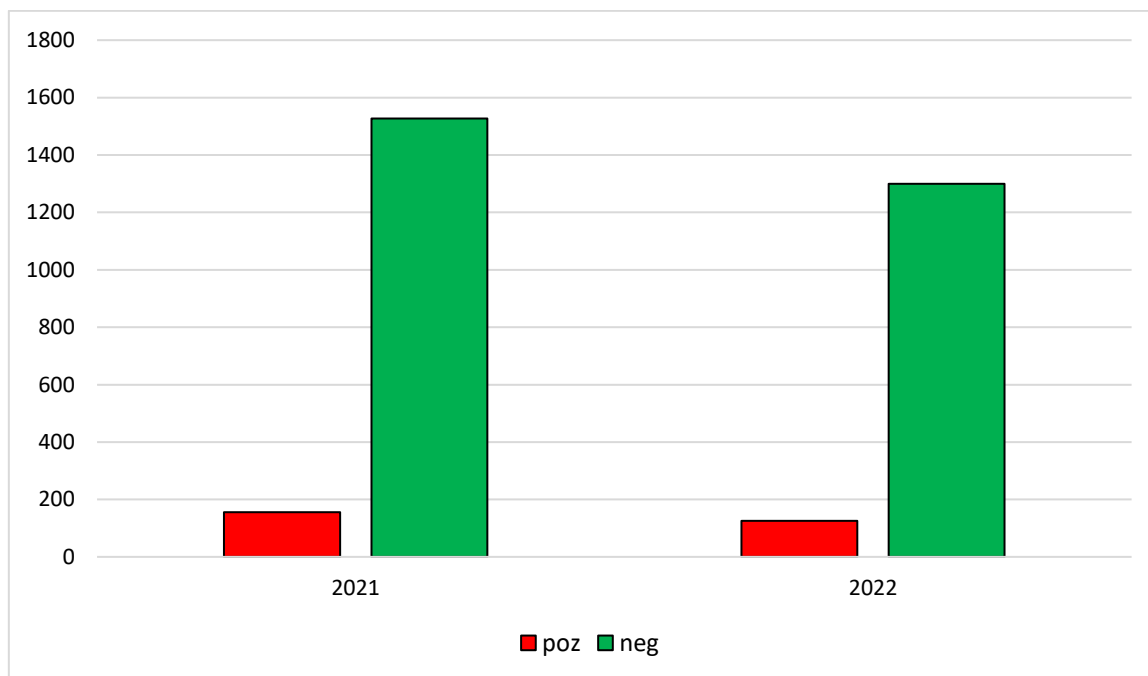
Druhou částí je příprava MasterMixu pro RT-PCR. K tomu je ve FN Plzeň využíván reakční set *Chlamydia trachomatis* od firmy Clonit (Itálie). MaterMix je připraven smícháním 210 μ l ampifikačního mMixu a 126 μ l *Ch. trachomatis* Mixu se sondami. Při takto zvoleném množství je možné z mixu stanovit až 16 vzorků. Poté následuje smíchání vzorku s připraveným MasterMixem do speciálních cycleroých zkumavek, v poměru 20 μ l MasterMixu a 5 μ l izolované DNA. Nakonec jsou takto připravené vzorky vloženy do PCR cycleru – Mic qPCR (BioMolecular Systems, Austrálie), a je provedeno naprogramování a zahájení RT-PCR reakce. Analýza trvá přibližně 1 hodinu a 45 minut. Po skončení přichází kvalifikovaný pracovník, který samotnou reakci odečítá a zapisuje výsledek do laboratorního systému. Takto zadaný výsledek je možné poté odeslat zadávajícímu lékaři – odesílá atestovaný lékař nebo jiný odborný pracovník v laboratorních metodách.

6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT INCIDENCE CHLAMYDIA TRACHOMATIS V LETECH 2021-2022 VE FN PLZEŇ

V této části bakalářské práce jsou statisticky zpracovány data incidence *Chlamydia trachomatis* ve Fakultní nemocnici Plzeň v několika kritériích.

V následujícím grafu je znázorněna míra pozitivity a negativity u všech vyšetřovaných pacientů na přítomnost bakterie *Chlamydia trachomatis*. Testování byli ženy, muži i děti. Celkem bylo za rok 2021 testováno 1683 pacientů, z čehož bylo pozitivních 156 pacientů a 1527 pacientů bylo negativních. V roce 2022 bylo testováno o několik pacientů méně, celkový počet činil 1426 testovaných pacientů celkem. Z tohoto počtu bylo pozitivních pouze 126 pacientů a 1300 pacientů bylo hodnoceno jako negativní. V následujícím **Grafu 1** je přehledně zobrazen poměr mezi pozitivními a negativními pacienty za období 2021 a 2022.

Graf 1 Podíl pozitivních a negativních výsledků detekce *Ch. trachomatis* za rok 2021 a 2022



Výsledky testování ukázaly, že ve velké převaze jsou negativní výsledky nad výsledky pozitivními. Dále byl pozorován mírný pokles počtu vyšetřovaných osob během roku 2022, na čemž mohlo mít dopad období pandemie COVIDEM-19.

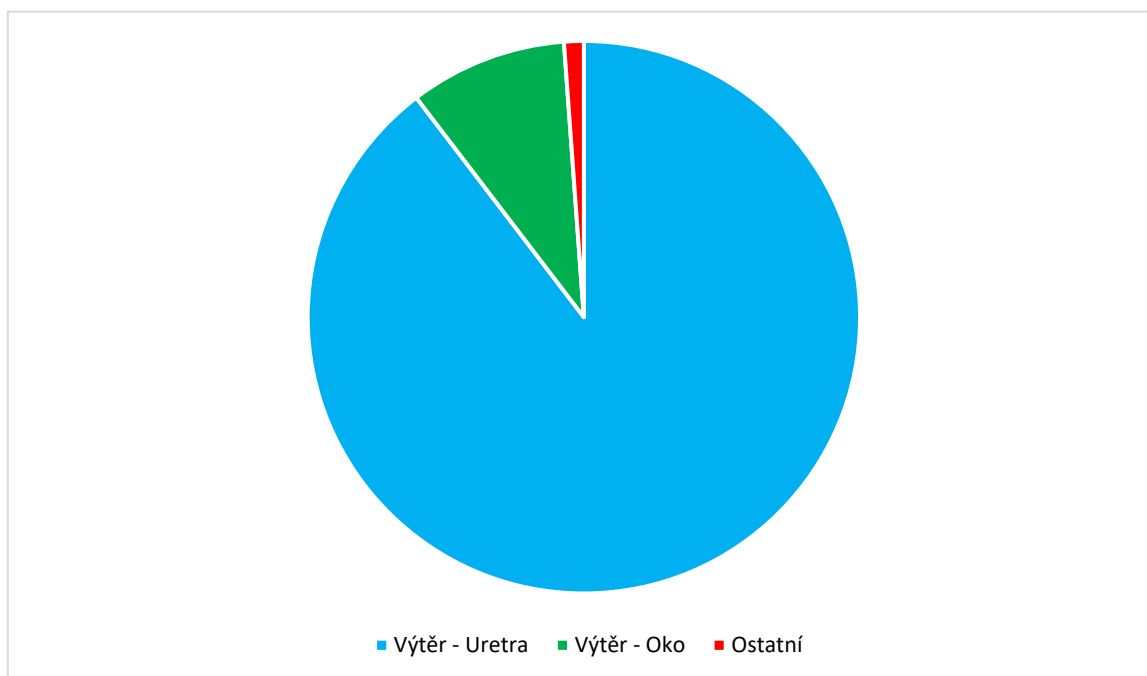
Dále bylo zhodnoceno, jaké materiály dorazily na Ústav mikrobiologie k detekci přítomnosti DNA *Ch. trachomatis*. Materiály byly rozděleny dle pohlaví, a data zpracována do tabulek a grafů.

U mužské populace byly nejčastěji zasílány materiály odebrané z uretry, druhým nejčastějším materiálem byl výtěr z oka, ostatní materiál byl zasílán ojediněle (**Tabulka 1**, **Graf 2**).

Tabulka 1 Testované materiály mužské populace za období 2021-2022

Materiál	Výtěr Uretra	Výtěr oko	Výtěr krk	Výtěr nosohltan	Stolice	Trachea	Punktát	Píštěl
Počet	1088	112	5	1	2	1	4	1

Graf 2 Testované materiály mužské populace za období 2021-2022



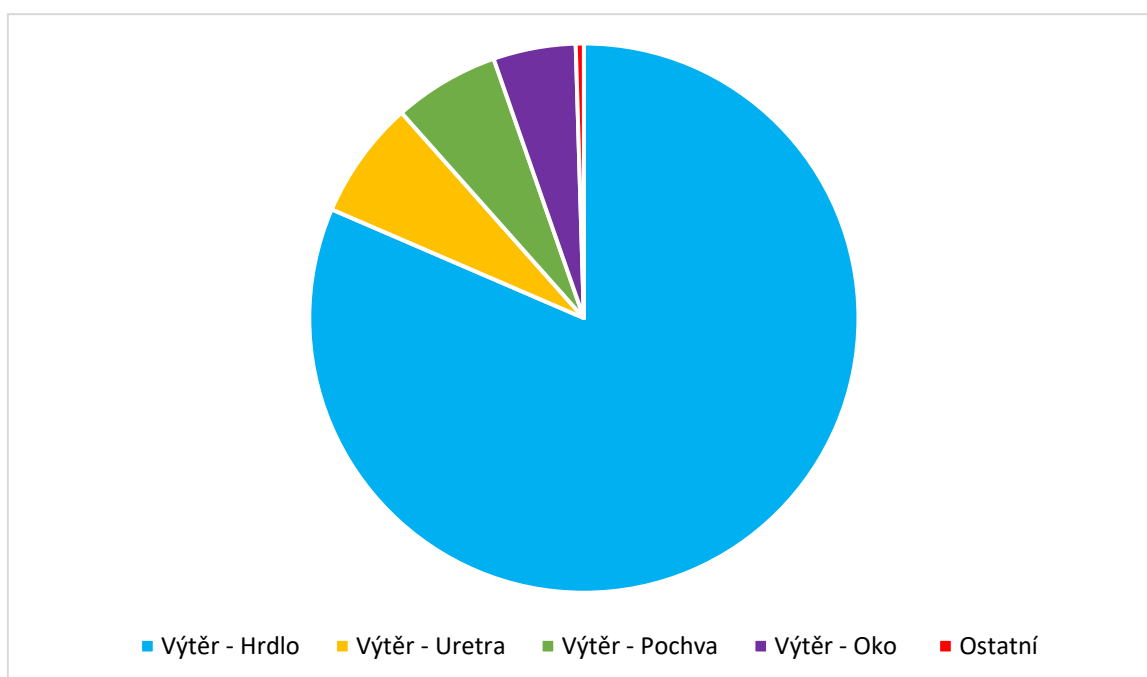
Poznámka Grafu 2: Materiál, který přicházel ojediněle, byl zařazen do kategorie ostatní pro lepší grafické znázornění.

U ženské populace bylo nejvíce provedeno výtěrů z hrdla děložního, druhým nejčastějším zasílaným materiálem byl výtěr z uretry, dále výtěr z pochvy a oka. Jiné materiály přicházely ojediněle (**Tabulka 2, Graf 3**).

Tabulka 2 Testované materiály od ženské populace za období 2021-2022

Materiál	Výtěr hrdlo	Výtěr uretra	Výtěr pochva	Výtěr oko	Výtěr krk	Moč	Likvor	Punktát	Stěr	Trachea
Počet	1544	132	118	92	3	2	1	1	1	1

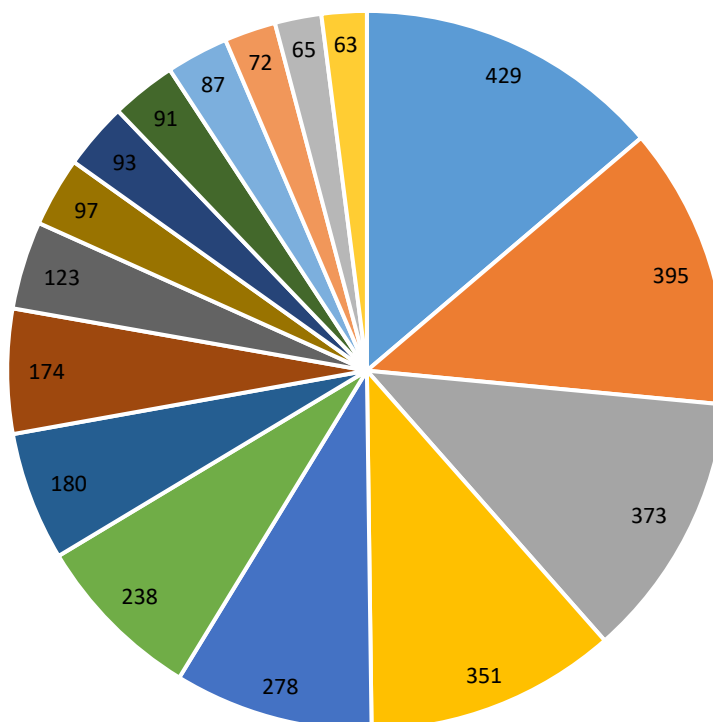
Graf 3 Testované matriály od ženské populace za období 2021-2022



Poznámka Grafu 3: Materiál, který přicházel ojediněle, byl pro lepší grafické znázornění zařazen do kategorie ostatní

V následujícím statistickém šetření byl brán ohled na samotné diagnózy pacientů s podezřením na infekci způsobenou *Chlamydia trachomatis*. U pacientů bylo celkem zachyceno 135 různých diagnóz. Vůbec nejčastější diagnózou byla nescifická uretritida, čímž se i potvrdilo z teoretických poznatků, že chlamydie nejčastěji vyvolávají urogenitální infekce. Dále byli pacienti ve vysokém počtu diagnostikováni pro cystitidu, pánevní a perineální bolesti nebo v případě žen pro stavy spojené s těhotenstvím. V následujícím **Grafu 4** jsou přehledně shrnuty nejčastější diagnózy. Pro grafickou přehlednost byly ojedinělé diagnózy a diagnózy s nižším počtem pacientů zařazeny do kategorie ostatní.

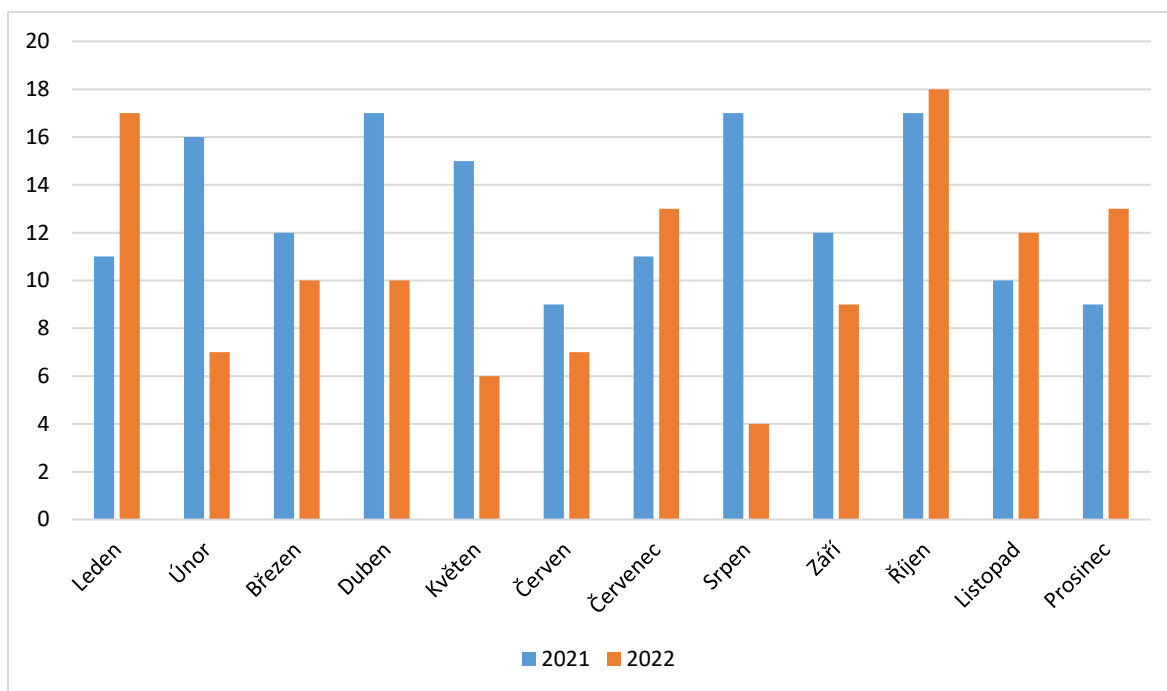
Graf 4 Nejčastější diagnózy pacientů s podezřením na infekci způsobenou Ch. trachomatis



- Ostatní
- Nespecifická uretritida
- Cystitida NS
- Pánevní a perineální bolest
- Dohled nad těhotenstvím s jinou nepříznivou reprodukční porodnickou anamnézou
- Infekce močového ústrojí neurčené lokalizace
- Stavy spojené s těhotenstvím NS
- Kontakt s infekcemi s převážně sexuálním způsobem přenosu a expozice
- Pohlavním stykem přenášené nemoci
- Jiná chlamydiová onemocnění přenášená pohlavním stykem, v jiných lokalizacích
- Akutní zánět pochvy – vaginitis acuta (colpitis)
- Jiné určené záněty pochvy a vulvy
- Mukopurulentní konjunktivitida
- Předčasná porodní činnost bez porodu
- Akutní konjunktivitida atopická
- Dohled nad normálním těhotenstvím NS

Jedním z dalších zajímavých kritérií je porovnání incidence *Chlamydia trachomatis* v průběhu ročních období za roky 2021 a 2022. V následujícím **Grafu 5** jsou znázorněny počty pozitivních případů za jednotlivé měsíce v letech 2021 a 2022.

Graf 5 Porovnání pozitivních záchytů *Ch. trachomatis* napříč lety 2021 a 2022



Během obou let bylo zachyceno celkem 282 pozitivních vzorků. V roce 2021 byl největší záchyt v měsících duben, květen a červen. Naopak nejmenší záchyt byl pozorován v červnu a prosinci. V roce 2022 byl zachycen největší výskyt v měsíci říjen, nejmenší byl pak v srpnu.

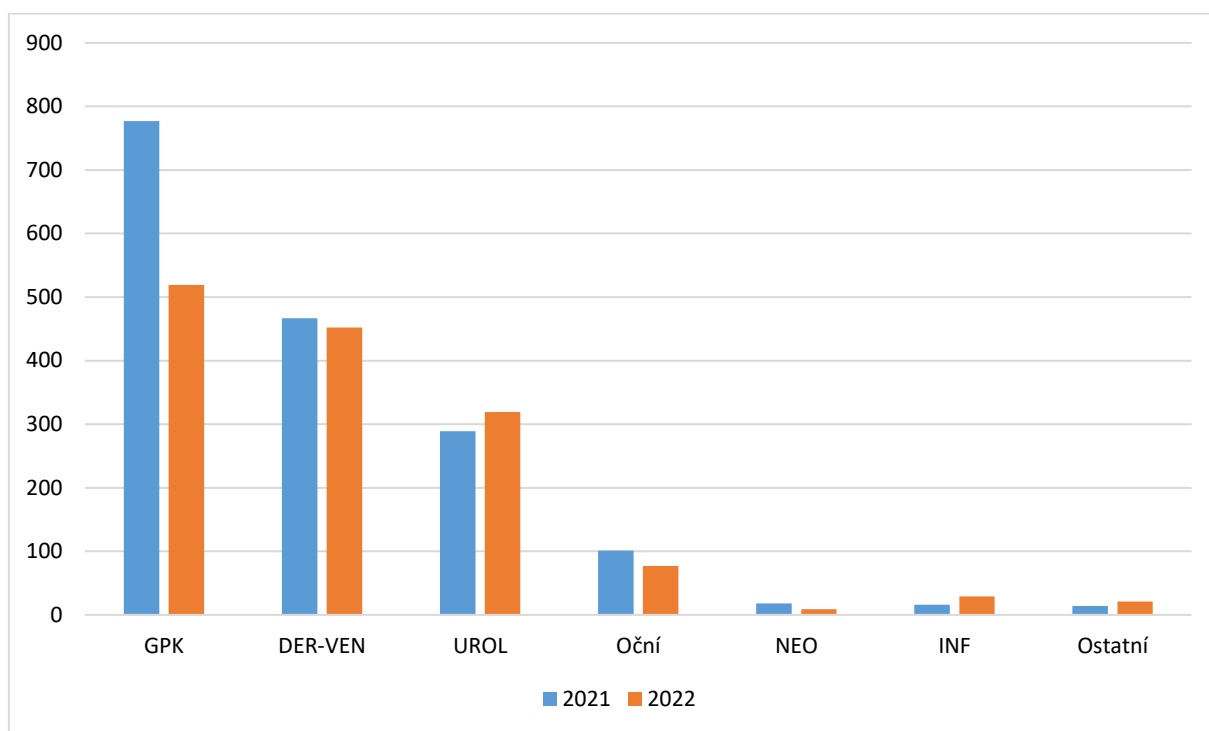
Posledním hodnotícím kritériem byl příjem vzorků z jednotlivých oddělení Fakultní nemocnice v Plzni. V **Tabulce 3** je přehledně shrnuto, z jakého oddělení byl materiál přijat a jaký byl celkový počet.

Tabulka 3 Přehled jednotlivých oddělení s celkovým počtem přijatých vzorků

	2021	2022	Počet celkem
Gynekologicko-porodnická klinika (GPK)	777	519	1296
Dermatovenerologická klinika (DER-VEN)	467	452	919
Urologická klinika	289	319	608
Oční klinika	101	77	178
Neonatologické oddělení	18	9	27
Infekční klinika	16	29	45
Dětská klinika	6	6	12
Interní klinika	3	7	10
Klinika ortopedie a traumatologie pohybového ústrojí (KOTPÚ)	2	3	5
Hematologicko-onkologické oddělení (HOO)	1	0	1
Operační sály Lochoťín	1	0	1
Psychiatrická klinika	1	0	1
Neurochirurgické oddělení	0	2	2
Chirurgické oddělení	0	1	1
Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (KARIM)	0	1	1
Klinika pneumologie a ftizeologie (PNEU)	0	1	1

Pro lepší grafické srovnání přijatého materiálu za sledované období byl vytvořen následující **Graf 6**. V grafu jsou uvedeny oddělení a kliniky s největším počtem zasláného materiálu. Kategorie ostatní zahrnuje pracoviště, která zasílala materiál ojediněle. Data z Grafu 6 vychází z **Tabulky 3**.

Graf 6 Přehled jednotlivých oddělení s počty přijatých materiálů za období 2021-2022



Legenda Grafu 6:

GPK ... Gynekologicko-porodnická klinika

DER-VEN ... Dermatovenerologická klinika

UROL ... Urologická klinika

Oční ... Oční klinika

NEO ... Neonatologické oddělení

INF ... Infekční klinika

Ostatní ... zahrnuje kliniky a oddělení s ojedinělým zasláním vzorků (kompletní data viz [Tabulka 3](#))

Převážná většina přijatých materiálů byla zaslána z gynekologicko-porodnické kliniky, kde celkový počet činil 1296, což byla téměř polovina zasláných materiálů za roky 2021 a 2022. Dále bylo nejvíce materiálů přijato z dermatovenerologického oddělení a urologické kliniky. Z ostatních oddělení a klinik materiál přicházel ojediněle.

DISKUZE

Cílem mé práce bylo zpracovat teorii různých molekulárně-genetických metod, které je možné využívat v klinické mikrobiologii. V praktické části se věnuji laboratorní diagnostice bakterie *Chlamydia trachomatis* vybranou metodou, kterou byla Real-Time PCR.

Prvním cílem praktické části bylo seznámení s možnostmi diagnostiky *Ch. trachomatis* v klinické praxi ve FN Plzeň. Nejprve jsem byl seznámen s prostory laboratoří, jejich vybavením a následně jsme přistoupili k diagnostickým setům a dále teoretickým podkladům a vlastní laboratorní práci.

Druhým cílem práce bylo provedení samotné laboratorní diagnostiky *Ch. trachomatis* za využití Real-Time PCR. Zde jsem postupoval dle oficiálních manuálů pro přípravu vzorku s pomocí a instruktáží personálu. V den konání bylo celkem analyzováno 16 vzorků, kdy se jednalo pouze o výtěry z urogenitálního traktu. Přestože jsme využili automatického izolátoru SaMag-12, byl jsem dále seznámen i s možností manuální izolace materiálů.

Posledním cílem práce bylo statistické zpracování výsledků klinických materiálů zasílaných pro podezření na přítomnost bakterie *Chlamydia trachomatis* ve FN Plzeň. Zde bylo zjištěno, že v letech 2021 a 2022 bylo celkem vyšetřeno 3109 pacientů. V naprosté převaze se jednalo o negativní výsledky s celkovým počtem 2827, téměř 91%. Pouze 9% (n = 282) materiálů bylo hodnoceno jako pozitivní. Výsledky tohoto poměru mě mile překvapily, protože v různých publikacích je psáno, že je celosvětově poměrně vysoký záchyt *Chlamydia trachomatis*.

V České republice nejsou známy přesné údaje o „promořenosti“ populace chlamydiovými infekcemi. To může být způsobeno například tím, že v některých zemích, příkladem USA, bylo zavedeno doporučení pro screening na přítomnost *Chlamydia trachomatis*. Huňátová Nela [69] se ve své bakalářské práci zmiňuje, že vyšší počet pozitivních záchytů přítomnosti *Ch. trachomatis* je u nás zaznamenáván zejména u mužů. Stejně závěry vyplynuly i z naší analýzy, kdy ve sledovaném období bylo pozitivních 166 mužů, a jen 116 žen.

Co se týče sezónnosti výskytu infekcí způsobených *Ch. trachomatis* nelze přesně říci, že by se onemocnění vyskytovalo například spíše v letních obdobích, ale vyskytuje se

celoročně. V roce 2021 byl pozorován nejvyšší výskyt v dubnu, srpnu a říjnu. Naopak nejmenší záchytnost byla v červnu. V roce 2022 byl největší záchyt v říjnu a nejmenší v srpnu. Nejvíce materiálu zasílala gynekologicko-porodnická klinika s celkovým počtem 1296. Dále materiál často pocházel z dermatovenerologické a urologické kliniky.

Dle článku od MUDr. Hynka Heřmana [65] není nutní celoplošné testování na přítomnost *Chlamydia trachomatis* u těhotných žen, osobně si ale myslím, že testování by mělo být zcela rutinní vzhledem k onemocněním, které tento patogen vyvolává. A dále také kvůli skutečnosti publikované zahraniční studií od Sethi et al. [70], ze které vyplývá, že chlamydiové infekce ve většině případů u žen probíhají zcela asymptomaticky. Doktor Heřman [65] se dále zmiňuje o poměrně alarmující skutečnosti, kdy je zaznamenávána vyšší mortalita novorozenců u pozitivně testovaných matek. Z našeho statistického šetření vyplynulo, že pouze jedna pozitivní matka byla hospitalizována pro neúplný potrat. Co se týče samotných novorozenců, bylo jich diagnostikováno pozitivních pouze 12, převážně v souvislosti s porodní hmotností nebo konjunktivitidou. To vyvrátilo tvrzení o vyšší mortalitě novorozenců.

Závěrem diskuze bych chtěl podotknout, že onemocnění chlamydiemi není možné brát na lehkou váhu. Onemocnění, která vyvolávají, jsou vážná a mohou ovlivnit jedince na celý život. Přestože jsme součástí vyspělých civilizací, jsou chlamydie stále, a troufám si i říci, i do budoucnosti celosvětovým problémem.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce s názvem „Využití molekulárně-genetických metod v klinické mikrobiologii“ je rozdělena na teoretickou a praktickou část.

V teoretické části jsou podány informace o laboratorních metodách, které jsou nejčastěji využívány v klinické mikrobiologii. Na začátku práce jsou zmíněny způsoby, jak zpracovat vzorek pro izolaci nukleových kyselin. Důraz se kladl především na kapitulu o metodách polymerázové řetězové reakce (PCR) a jejích některých modifikacích, dále zde nalezneme techniky jako jsou hybridizace či sekvenování. Ke všem věnovaným metodám v této práci je rovněž sepsáno i jejich využití.

V praktické části jsem se věnoval laboratorní diagnostice sexuálně přenosného patogenu, čímž byla *Chlamydia trachomatis*. Dále v této části můžeme nalézt zpracovanou statistiku sledovaného souboru. Přestože výsledky ze statistiky nepůsobí, že výskyt této bakterie byl příliš vysoký, musíme brát v potaz, že se jednalo jen o výsledky z Fakultní nemocnice Plzeň. Je důležité zmínit, že onemocnění tímto patogenem je stále v současnosti celosvětový problém, který je potřeba i nadále řešit.

Díky sepsání této bakalářské práce, se mi rozšířili především teoretické, ale i praktické znalosti a dovednosti. V budoucnosti by tato bakalářská práce mohla být ku prospěchu novým zdravotním laborantům k pochopení zmíněných metod.

SEZNAM LITERATURY

1. DRNKOVÁ, Barbora. Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory. Grada Publishing, as, 2019. ISBN 978-80-271-0693-6.
2. GOERING, Richard, et al. Mims' Medical Microbiology E-Book. Elsevier Health Sciences, 2018. ISBN 978-07-020-7154-6.
3. KOČÁREK, Eduard. Molekulární biologie v medicíně. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 978-80-7013-450-
4. MALHOTRA, S., et al. Molecular methods in microbiology and their clinical application. J Mol Genet Med, 2014, 8: 142.
5. HRABÁK, Jaroslav, et al. Aplikace metod molekulární genetiky v klinické mikrobiologii: Zpráva z jednání Pracovní skupiny molekulární mikrobiologie-TIDE. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie., 2010, 3.
6. RACLAVSKÝ, Vladislav. Úvod do základních metod molekulární genetiky. Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, 1998. ISBN 80-7067-892-5
7. OTOVÁ, Berta; MIHALOVÁ, Romana; BOBKOVÁ, Klára. Základy biologie a genetiky člověka. Charles University in Prague, Karolinum Press, 2021. ISBN 978-80-246-4565-0
8. BUCKINGHAM, L.; FLAWS, M. L. Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods & Clinical Applications (FA Davis Eds). Philadelphia, Pa, USA, 2007, ISBN 978-14-160-3737-8.
9. Jáchym, Metody molekulární biologie, 2012
10. BROWN, Terence A. Gene cloning and DNA analysis: an introduction. John Wiley & Sons, 2020. ISBN 978-11-196-4078-3
11. MolOch; Molekulární metody v ekologii mikroorganismů. Přírodovědecká fakulta Univerzita Palackého v Olomouci, 2014-2015. Dostupné z: <http://www.moloch.upol.cz/uploads/vyukovy-portal/mmem-5-izolace-dna.pdf>

12. LENNETTE, E. H., et al. Virus isolation and identification. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice: VOLUME II Viral, Rickettsial, and Chlamydial Diseases, 1988, 39-59.
13. IKER, Brandon C.; KITAJIMA, Masaaki; GERBA, Charles P. Extraction and purification of viral nucleic acids from environmental samples. Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples, 2016, 315-324.
14. BURSOVÁ, Šárka, et al. Mikrobiologické laboratorní metody. FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE. BRNO, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6.
15. BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Applied microbiology and biotechnology, 2006, 73.3: 495-504.
16. FREEMAN, Willard M.; WALKER, Stephen J.; VRANA, Kent E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques, 1999, 26.1: 112-125.
17. GARIBYAN, Lilit; AVASHIA, Nidhi. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). The Journal of investigative dermatology, 2013, 133.3: e6.
18. STANĚK, L. Polymerázová řetězcová reakce: princip metody a využití v molekulární patologii. Česko-slovenská patologie, 2013, 49.3: 119-121.
19. DENOMME, Gregory A.; RIOS, Maria; REID, Marion E. Molecular protocols in transfusion medicine. Elsevier, 2000. ISBN 978-01-220-9370-8
20. ŠMARDA, Jan, et al. Metody molekulární biologie. 2005. ISBN 978-80-210-3841-7
21. DE, Sachinandan, et al. Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. Food Control, 2011, 22.5: 690-696.
22. SANTOS, Carlos Ferreira dos, et al. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. Journal of applied oral science, 2004, 12: 1-11.

23. BONIN, Serena; DOTTI, Isabella. Nested-PCR. In: Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 111-114.
24. VAN PELT-VERKUIL, Elizabeth; VAN BELKUM, Alex; HAYS, John P. Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer Science & Business Media, 2008. ISBN 978-1-4020-6240-7
25. PAUL, Natasha; SHUM, Jonathan; LE, Tony. Hot start PCR. In: RT-PCR Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, 2010. p. 301-318.
26. NOTOMI, Tsugunori, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. Journal of microbiology, 2015, 53.1: 1-5.
27. SOROKA, Marianna; WASOWICZ, Barbara; RYMASZEWSKA, Anna. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR?. Cells, 2021, 10.8: 1931.
28. WONG, Y.-P., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. Journal of applied microbiology, 2018, 124.3: 626-643.
29. VALONES, Marcela Agne Alves, et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. Brazilian Journal of Microbiology, 2009, 40.1: 1-11.
30. KRÁLOVÁ, Blanka, et al. Bioanalytické metody. 3. vyd. Praha: VŠCHT, 2007. 254 s. ISBN 978-807080-449-3.
31. HERSCHLEB, Jill; ANANIEV, Gene; SCHWARTZ, David C. Pulsed-field gel electrophoresis. Nature protocols, 2007, 2.3: 677-684.
32. DOI, Matsuko, et al. Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important Candida species. Microbiology, 1992, 138.10: 2243-2251.
33. PARIZAD, Elaheh Gholami; PARIZAD, Eskandar Gholami; VALIZADEH, Azar. The application of pulsed field gel electrophoresis in clinical studies. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 2016, 10.1: DE01.

34. BASIM, Esin; BASIM, Huseyin. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. *Turkish Journal of Biology* 2001, 25, s. 405-418
35. LI, Wenjun; RAOULT, Didier; FOURNIER, Pierre-Edouard. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS microbiology reviews*, 2009, 33.5: 892-916.
36. VAN BELKUM, Alex, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007, 13: 1-46.
37. MACCANNELL, Duncan. Bacterial strain typing. *Clinics in laboratory medicine*, 2013, 33.3: 629-650.
38. TENOVER, Fred C., et al. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 1997, 18.6: 426-439.
39. RANJBAR, Reza, et al. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiologica*, 2014, 37.1: 1-15.
40. ORSINI, Massimiliano; ROMANO-SPICA, Vincenzo. A rapid PFGE protocol for typing *Legionella* isolates from fresh or frozen samples. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2012, 18: 747-752.
41. DAI, Shutao; LONG, Yan. Genotyping analysis using an rflp assay. In: *Plant Genotyping*. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 91-99. ISBN 978-1-4939-1966-6.
42. CHATTERJEE, Shruti; RAVAL, Ishan H. Pathogenic microbial genetic diversity with reference to health. In: *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Academic Press, 2019. p. 559-577.
43. MITTAL, B.; CHATURVEDI, P.; TULSYAN, S. *Restriction fragment length polymorphism*. 2013.
44. BROWN, Terry. Southern blotting. *Current protocols in molecular biology*, 1993, 21.1: 2.9. 1-2.9. 20.

45. KURIEN, Biji T.; SCOFIELD, R. Hal. Western blotting. *Methods*, 2006, 38.4: 283-293.
46. RELLER, L. Barth, et al. Infectious disease pathology. *Clinical infectious diseases*, 2001, 32.11: 1589-1601.
47. SKLAR, Jeffrey. DNA hybridization in diagnostic pathology. *Human pathology*, 1985, 16.7: 654-658.
48. SEDIVCOVÁ, Monika, et al. Sequencing-classical method. *Ceskoslovenska patologie*, 2013, 49.3: 122-128.
49. BUCHAN, Blake W.; LEDEBOER, Nathan A. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clinical microbiology reviews*, 2014, 27.4: 783-822.
50. HEATHER, James M.; CHAIN, Benjamin. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 2016, 107.1: 1-8.
51. AHMADIAN, Afshin; EHN, Maria; HOBBER, Sophia. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica chimica acta*, 2006, 363.1-2: 83-94.
52. KCHOUK, Mehdi; GIBRAT, Jean-Francois; ELLOUMI, Mourad. Generations of sequencing technologies: from first to next generation. *Biology and Medicine*, 2017, 9.3.
53. LIU, Lin, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 2012.
54. DESAI, Aarti N.; JERE, Abhay. Next-generation sequencing: ready for the clinics?. *Clinical genetics*, 2012, 81.6: 503-510.
55. ANN LUNA, Ruth. Molecular Typing Instruments and Methods. *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology: International Edition*, 2016, 336-345.
56. BEHJATI, Sam; TARPEY, Patrick S. What is next generation sequencing?. *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 2013, 98.6: 236-238.

57. QUAINOO, Scott, et al. Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *Clinical microbiology reviews*, 2017, 30.4: 1015-1063.
58. HU, Taishan, et al. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 2021, 82.11: 801-811.
59. FONG-FLORES, Víctor, et al. Sanger Sequencing Implementation in Clinically Ill Patients for Bacterial and Fungal Pathogens Identification. *Advances in Infectious Diseases*, 2022, 12.3: 363-382.
60. YU, Xiaoling, et al. Applications of sequencing technology in clinical microbial infection. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23.11: 7143-7150.
61. KÖSER, Claudio U., et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. 2012.
62. BERTELLI, C.; GREUB, G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013, 19.9: 803-813.
63. COHEN, Jonathan; POWDERLY, William G.; OPAL, Steven M. *Infectious Diseases E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2016.
64. HOROVÁ, Blanka. Chlamydiové infekce: příznaky, diagnostika, interpretace výsledků a léčba. *Medicína pro praxi*, 2011, 8: 528-531.
65. HEŘMAN, Hynek. Chlamydiové infekce v gynekologii a porodnictví. *Moderní babictví*, 2005, 6: 1-4
66. HAVLÍK, Jiří. Chlamydie patogenní pro člověka – klinika a terapie, *Interní Medicína*, 2007; 9(10): 429–432.
67. HEJNAR, MUDr Petr. Sérologická diagnostika chlamydiových infekcí a toxoplazmózy. *Interní medicína pro praxi*, 2001, 7: 305-308.
68. POLCAROVÁ, Drahomíra; ZÁKOUCKÁ, Hana. Diagnostika chlamydiových infekcí. *Urol. praxi*, 2015; 16(2): 61–64
69. HUŇÁTOVÁ, Nela, et al. Laboratorní diagnostika pohlavně přenosných infekcí. 2021.

70. SETHI, Sunil, et al. Detection of Chlamydia trachomatis infections by polymerase chain reaction in asymptomatic pregnant women with special reference to the utility of the pooling of urine specimens. The Indian Journal of Medical Research, 2017, 146.Suppl 1: S59.

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Povolení sběru informací ve Fakultní nemocnici v Plzni

PŘÍLOHY

Příloha A – Povolení sběru informací ve Fakultní nemocnici v Plzni



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ
Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči
Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážený pan

Radek Halama

Student oboru *Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví*

*Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
Západočeská univerzita v Plzni*

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat a výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Využití molekulárně-genetických metod v klinické mikrobiologii*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.**
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je paní ***Chudějová Kateřina, Mgr., Ph.D., odborný pracovník v laboratorních metodách a přípravě léčivých přípravků MIKRO FN Plzeň.***

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

*Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči*

*Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel. 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz*

19. 5. 2022