

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**DETEKCE A IDENTIFIKACE *CAPNOCYTOPHAGA CANIMORSUS***  
**METODOU PCR**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**AUTOR PRÁCE:** Bc. Lucie Jankovičová

**VEDOUCÍ PRÁCE:** RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D.

**KONZULTANT:** Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.

**2022**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**DETECTION AND IDENTIFICATION OF *CAPNOCYTOPHAGA*  
*CANIMORSUS* BY PCR METHOD**

DIPLOMA THESIS

**AUTHOR:** Bc. Lucie Jankovičová

**SUPERVISOR:** RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D.

**CONSULTANT:** Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.

**2022**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Jankovičová**  
Osobní číslo: **C20450**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Detekce a identifikace *Capnocytophaga canimorsus* metodou PCR**  
Téma práce anglicky: **Detection And Identification Of *Capnocytophaga canimorsus* By PCR Method**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši k zadanému tématu. V úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o bakteriálním rodu *Capnocytophaga*.
2. Uveďte možnosti detekce a identifikace bakterie *Capnocytophaga canimorsus* se zaměřením na molekulárně biologické metody.

### Experimentální část:

1. Zaveďte a optimalizujte qPCR metodu pro sbírkový kmen *Capnocytophaga canimorsus*.
2. Optimalizovanou metodu aplikujte na kmeny získané z přirozeného prostředí.
3. Získané výsledky vhodným způsobem interpretujte.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice 'Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Markéta Vyržalová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.** v.r.  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Detekce a identifikace *Capnocytophaga canimorsus* metodou PCR jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5.5.2022

Bc. Lucie Jankovičová v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své konzultance Ing. Květě Koryčanové, PhD. za cenné rady, za čas, který mi věnovala, a hlavně za podporu, pochopení a ochotu mě vést i navzdory tomu, že cesta k cíli nebyla vůbec snadná. Velké díky patří také kolegyním, přátelům a rodině za jejich toleranci, ohleduplnost a především psychickou podporu jak při psaní této práce, tak po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Tato práce se zaměřuje na diagnostiku a identifikaci bakterie *Capnocytophaga canimorsus*. V úvodní části jsou popsány obecné vlastnosti a charakteristika celého rodu *Capnocytophaga* a je zde vysvětleno, proč je důležité této bakterii a její identifikaci věnovat větší pozornost. Hlavní část práce se pak zabývá podrobnějším popisem možností diagnostiky. Je zde optimalizována metoda polymerázové řetězové reakce v reálném čase a s použitím vzorků odebraných z ústní dutiny psů a koček porovnána s jinými běžně používanými metodami identifikace.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Capnocytophaga*, *Capnocytophaga canimorsus*, real-time PCR, kapnofilní bakterie, psí kousnutí

## **TITLE**

Detection And Identification Of *Capnocytophaga canimorsus* By PCR Method

## **ANNOTATION**

This thesis focuses on the diagnostics and identification of the bacterium *Capnocytophaga canimorsus*. The introductory part describes the general characteristics of the genus *Capnocytophaga* and explains why it is important to pay more attention to this bacterium and its identification. The main part of the thesis deals with more detailed description of diagnostics options. The real-time polymerase chain reaction method is optimized and compared with other commonly used identification methods using samples taken from the oral cavity of dogs and cats.

## **KEYWORDS**

*Capnocytophaga*, *Capnocytophaga canimorsus*, real-time PCR, capnophilic bacteria, dog bite



# OBSAH

<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>11</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>12</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ</b> .....	<b>13</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK</b> .....	<b>14</b>
<b>ÚVOD</b> .....	<b>15</b>
<b>1 ROD CAPNOCYTOPHAGA</b> .....	<b>16</b>
1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA RODU .....	17
1.1.1 <i>BIOCHEMICKÉ TESTY</i> .....	17
1.1.2 <i>POHYB</i> .....	18
1.2 INTERAKCE S IMUNITNÍM SYSTÉMEM.....	19
1.3 CITLIVOST NA ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY .....	20
1.4 CAPNOCYTOPHAGA CANIMORSUS.....	20
1.4.1 <i>HISTORIE</i> .....	20
1.4.2 <i>MORFOLOGIE, KULTIVACE A IZOLACE</i> .....	21
1.4.3 <i>PROJEVY ONEMOCNĚNÍ</i> .....	23
1.4.4 <i>PATOGENITA A FAKTORY VIRULENCE</i> .....	23
1.4.5 <i>DIAGNOSTIKA</i> .....	24
1.4.6 <i>LÉČBA</i> .....	24
1.4.7 <i>RIZIKOVÉ SKUPINY</i> .....	25
1.4.8 <i>INFEKCE ZVÍŘAT</i> .....	26
1.4.9 <i>KONKRÉTNÍ PŘÍPADY ONEMOCNĚNÍ ČLOVĚKA</i> .....	26
<b>2 METODY VYUŽÍVANÉ K DETEKCI A IDENTIFIKACI</b> .....	<b>30</b>
2.1 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE .....	30
2.1.1 <i>MALDI</i> .....	30
2.1.1.1 IDENTIFIKACE <i>CAPNOCYTOPHAGA CANIMORSUS</i> POMOCÍ MALDI - TOF .....	32
2.2 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY .....	32
2.2.1 <i>IZOLACE NUKLEOVÉ KYSELINY</i> .....	32
2.2.2 <i>SEKVENOVÁNÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN</i> .....	33
2.2.2.1 PRAKTICKÉ VYUŽITÍ .....	34

2.2.3	<i>POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE</i> .....	35
2.2.4	<i>REAL-TIME PCR (RQ-PCR, qPCR)</i> .....	38
2.2.4.1	ZÁKLADNÍ SOUČÁSTI PCR .....	39
2.2.5	<i>VÝHODY A NEVÝHODY MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICÝCH METOD</i> .....	40
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>43</b>
4.1	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ .....	43
4.2	LABORATORNÍ POMŮCKY .....	43
4.3	KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	44
4.4	REAGENCIE K PROVEDENÍ MORFOLOGICKÝCH TESTŮ .....	45
4.5	REAGENCIE K PROVEDENÍ PCR .....	46
4.6	REAGENCIE K PROVEDENÍ REAL-TIME PCR .....	46
4.7	KULTIVACE .....	47
4.8	MIKROSKOPIE .....	47
4.9	PRŮKAZ METODOU PCR .....	47
4.9.1	<i>PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU</i> .....	48
4.9.2	<i>DETEKCE NA GELU</i> .....	48
4.10	IZOLACE DNA ZE VZORKŮ (PRO POUŽITÍ V REAL-TIME PCR) .....	49
4.11	STANOVENÍ <i>CAPNOCYTOPHAGA CANIMORSUS</i> POMOCÍ REAL-TIME PCR .....	51
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>53</b>
5.1	PRŮKAZ METODOU PCR .....	53
5.2	REAL-TIME PCR .....	53
5.2.1	<i>OPTIMALIZACE METODY</i> .....	53
5.2.1.1	OVĚŘENÍ SPECIFITY .....	54
5.2.1.2	STANOVENÍ SENZITIVITY .....	57
5.2.1.3	KVANTIFIKACE .....	58
5.3	POROVNÁNÍ PCR METOD .....	60
5.3.1.1	TESTOVÁNÍ REÁLNÝCH VZORKŮ .....	62
5.4	VÝSLEDKY KULTIVACE A IZOLACE .....	67
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>70</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b> <i>Capnocytophaga canimorsus</i> pod mikroskopem obarvená dle Grama (11) .....	22
<b>Obrázek 2</b> Růst <i>Capnocytophaga canimorsus</i> na krevním agaru s 10 % beraní krve (Obrázek z archivu autora).....	22
<b>Obrázek 3</b> Infekce <i>Capnocytophaga canimorsus</i> u králíka po pokousání psem (11).....	26
<b>Obrázek 4</b> Koagulopatické kožní léze (30).....	27
<b>Obrázek 5</b> Nekrotická tkáň v místě kousnutí (23) .....	28
<b>Obrázek 6</b> Princip MALDI-TOF metody (4).....	31
<b>Obrázek 7</b> Grafické znázornění všech kroků polymerázové řetězové reakce (4).....	36
<b>Obrázek 8</b> Thermocycler od firmy BIO-RAD (Obrázek z archivu autora) .....	37
<b>Obrázek 9</b> Jednoduchý graf znázorňující sílu fluorescenčního signálu detekovaného na přístroji pro real-time PCR (57) .....	39
<b>Obrázek 10</b> Detekce <i>C. canimorsus</i> na agarózovém gelu. M = DNA marker, P = pozitivní kontrola, N = negativní kontrola (Obrázek z archivu autora) .....	49
<b>Obrázek 11</b> Princip izolace nukleové kyseliny na kolonkách (53).....	51
<b>Obrázek 12</b> Vyhodnocení pozitivního vzorku (4).....	52
<b>Obrázek 13</b> Růst <i>Capnocytophaga cynodegmi</i> na krevním agaru (Obrázek z archivu autora) .....	56
<b>Obrázek 14</b> Krevní agar přerostlý mikroflórou z dutiny ústní kočky (Obrázek z archivu autora).....	60
<b>Obrázek 15</b> <i>Capnocytophaga canimorsus</i> barvená dle Grama (Obrázek z archivu autora)...	68

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1</b> Přehled a porovnání biochemických charakteristik (16) .....	18
<b>Tabulka 2</b> Stanovení kalibrační řady .....	59
<b>Tabulka 3</b> Porovnání vzorků psů .....	61
<b>Tabulka 4</b> Porovnání vzorků koček. Vzorky, které jsou v tabulce označeny žlutě mají rozdílný výsledek. ....	61
<b>Tabulka 5</b> Výsledky testovaných psů.....	63
<b>Tabulka 6</b> Výsledky testovaných koček.....	65

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1</b> Ověření specifity reakce.....	55
<b>Graf 2</b> Ověření, zda primery nereagují s <i>C. cynodegmi</i> . .....	57
<b>Graf 3</b> Stanovení senzitivity reakce pomocí desítkového ředění. Osa X zobrazuje počet cyklů a osa Y fluorescenci. ....	58
<b>Graf 4</b> Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace DNA v neznámém vzorku.....	59

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

<i>BRCA1</i>	Gen rakoviny prsu 1 („breast cancer gene 1“)
<i>BRCA2</i>	Gen rakoviny prsu 2 („breast cancer gene 2“)
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina („complementary deoxyribonucleic acid“)
ddNTP	Dideoxynukleosidtrifosfát
DF-2	Dysgonický fermentor typu 2
DIC	Diseminovaná intravaskulární koagulace
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxynukleosidtrifosfát
EDTA	Etylendiamintetraoctová kyselina
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
MALDI-TOF	Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s analyzátozem doby letu
ONPG	(O-nitrofenyl- $\beta$ -D-galatosid)
PCR	Polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
rRNA	Ribosomální ribonukleová kyselina
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase („real-time polymerase chain reaction“)
RNA	Ribonukleová kyselina
TBE	Tris-borát-EDTA
TLR-4	Toll-like receptor 4
TOF	Doba letu („time of flight“)
UV	Ultrafialové záření („ultra-violet“)

## ÚVOD

Podle odhadů veterinárních lékařů s námi žije na celém světě zhruba 500 milionů psů a necelých 400 milionů koček. Miliony lidí je každý rok nějakým psem nebo kočkou pokousáno. Bakterie v ústní dutině těchto zvířat mohou při pokousání nebo jiném kontaktu způsobovat u lidí nejrůznější onemocnění. Zhruba 5-10 % z těchto kousnutí se u člověka projeví nějakou infekcí a podle statistik z USA průměrně 6 lidí ze 100 milionů na tuto infekci zemře (1; 2).

Bakterie *Capnocytophaga canimorsus* je jedna z těch bakterií, která je součástí orální flóry až 74 % psů a 57 % koček a na člověka může být přenesena pokousáním, poškrábáním nebo expozicí zvířecím slinám s narušenou kožní či slizniční bariérou. Obecně má poměrně nízkou virulenci a u zdravého člověka se infekce neprojeví. U lidí s oslabeným imunitním systémem však může způsobovat velmi závažné zdravotní problémy (3).

V minulosti byli lékaři při diagnostice onemocnění závislí pouze na výsledcích kultivace a biochemických testů, což nebylo vždy dostačující. Velké množství bakterií se kultivuje velmi špatně, nebo jsou v laboratorním prostředí nekultivovatelné. Kultivace je také v porovnání s jinými metodami poměrně časově náročná. Mezi kultivačně náročnější bakterie se řadí i *Capnocytophaga canimorsus*.

Včasná a správná diagnostika, hraje při léčbě infekce nepostradatelnou roli. A právě komplikovaný průkaz této bakterie je pro lékaře zásadní problém, protože znemožňuje rychlé nasazení správné antibiotické léčby.

V současné době se tedy častěji přistupuje k molekulárně biologickým metodám, které jsou rychlejší a přesnější. Těmito metodami jsme schopni rychle a spolehlivě diagnostikovat bakterie *Capnocytophaga* na úrovni druhu a především od sebe odlišit *Capnocytophaga canimorsus* a *Capnocytophaga cynodegmi*, které jsou si geneticky a biochemicky velmi podobné a donedávna neexistovala metoda, která by byla schopna je 100 % rozpoznat (4).

# 1 ROD CAPNOCYTOPHAGA

Bakterie rodu *Capnocytophaga* se běžně vyskytují v ústní dutině. Tyto bakterie nejsou pro zdravého člověka nijak nebezpečné a jsou považovány za běžnou mikroflóru. Nejvíce pozornosti je v současnosti věnováno druhům *Capnocytophaga canimorsus* a *Capnocytophaga cynodegmi*, které osidlují ústní dutinu psů a koček, mohou být přeneseny na člověka a způsobovat lokální i vážné systémové infekce. Se systémovými infekcemi je spojována především *Capnocytophaga canimorus*. *C. cynodegmi* způsobuje spíše infekce ran a ojediněle peritonitidy (5; 6; 7).

Název *Capnocytophaga* je odvozen z latinského- „capno“- bakterie vyžadující oxid uhličitý a „cytophaga“ je výraz popisující jejich flexibilitu a pohyblivost. Například název „Canimorsus“ je pak odvozen z latinského „cani“ - pes a „morsus“ - kousat (1).

Bakterie rodu *Capnocytophaga* patří do kmene *Bacteroidetes* a čeledi *Flavobacteriaceae*, která zahrnuje mimo jiné další komenzály, které se vyskytují v ústní dutině psů a koček. Kromě již dvou zmiňovaných je v literatuře (8) aktuálně popsáno dalších jedenáct druhů rodu *Capnocytophaga*. Konkrétně se jedná o

*Capnocytophaga bilanii*

*Capnocytophaga canis*

*Capnocytophaga endodontalis*

*Capnocytophaga felis*

*Capnocytophaga gingivalis*

*Capnocytophaga granulosa*

*Capnocytophaga haemolytica*

*Capnocytophaga leadbetteri*

*Capnocytophaga ochracea*

*Capnocytophaga periodontitidis*

*Capnocytophaga sputigena*

Bakterie *Capnocytophaga gingivalis*, *C. ochracea*, a *C. sputigena* se přirozeně vyskytují v lidských ústech a jejich roli při rozvoji různých onemocnění se věnuje několik výzkumných prací (9).

*Capnocytophaga* spp. jsou součástí skupiny mikroorganismů, kterým se říká HACEK (*Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraprophilus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Cardiobacterium*



*hominis*, *Eikenella corrodens* a *Kingella kingae*). Společným znakem všech těchto bakterií je, že mohou způsobovat endokarditidu, artritidu, osteomyelitidu anebo periodontitidu. Riziko onemocnění se výrazně zvyšuje po prodělané splenektomii, při nadměrném pití alkoholu, inzulin-dependentním diabetu nebo u pacientů, kteří užívají imunosupresiva (10).

## 1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA RODU

Rod *Capnocytophaga* je identifikován jako skupina náročných, vřetenovitých, gramnegativních, nesporotvorných, klouzavých, nebičkových bakterií, jejichž růst je podporován kapnofilní atmosférou. Morfologicky jsou velmi podobné fusobakteriím a mohou se vyskytovat i ve filamentárních nebo kokoidních formách (11).

Pouze v málo případech byla bakterie pozorována přímo pod mikroskopem barvením dle Grama. *Capnocytophaga* spp. jsou popisovány jako náročné organismy, jejichž kultivace je možná na krevním agaru inkubovaném v anaerobní nebo kapnofilní atmosféře s minimálně 5 % oxidu uhličitého po dobu 2-3 dnů nebo v lahvích s anaerobními hemokulturami (11; 12). Na krevním agaru netvoří hemolýzu a ke svému růstu potřebuje teplotu 30-37 °C (11).

Kultivace a biochemická charakterizace se již dlouhou dobu používají jako standardní diagnostický postup v bakteriologických laboratořích. V posledních letech byly tyto klasické metody doplněny o moderní diagnostické nástroje, jako jsou technologie založené na detekci nukleových kyselin (sekvenování, PCR) a MALDI-TOF (4; 13).

Vzhledem k rozmanitým faktorům virulence a zvláštní rezistenci některých druhů je zásadní rychlá a přesná identifikace jejich izolátů (14).

### 1.1.1 BIOCHEMICKÉ TESTY

Bakterie *Capnocytophaga* jsou pozitivní na glukózu, maltózu, laktózu a test pohyblivosti. Dále jsou negativní na sacharózu, mannitol, indol, ureázu a nitrát. Většina těchto testů se ale při identifikaci neprovádí. V praxi se používají pouze katalázové a oxidázové testy. Ne všechny bakterie z tohoto rodu mají biochemické testy stejné. Pozitivní na oxidázu a katalázu jsou pouze *C. canimorsus* a *C. cynodegmi*. Lidské druhy jsou na tyto testy negativní (15; 16).

**Tabulka 1** Přehled a porovnání biochemických charakteristik (16)

Charakteristika	<i>C. canimorsus</i>	<i>C. cynodegmi</i>	<i>Capnocytophaga</i> spp.
Hemolýza	Negativní	Negativní	Negativní
Růst na MacConkey agaru	Negativní	Negativní	Negativní
Indol	Negativní	Negativní	Negativní
Ureáza	Negativní	Negativní	Negativní
Lysin dekarboxyláza	Negativní	Negativní	Negativní
Ornithin dekarboxyláza	Negativní	Negativní	Negativní
NO <sub>3</sub> → NO <sub>2</sub>	Negativní	Variabilní	Variabilní
NO <sub>2</sub> → N <sub>2</sub>	Variabilní	Variabilní	Negativní
Hydrolyza eskulinu	Variabilní	Pozitivní	Variabilní
Hydrolyza ONPG	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
Arginin dihydroláza	Pozitivní	Pozitivní	Negativní
Oxidáza	Pozitivní	Pozitivní	Negativní
Kataláza	Pozitivní	Pozitivní	Negativní
Inulin	Negativní	Pozitivní	Negativní
Glukóza	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
Maltóza	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
Fruktóza	Variabilní	Pozitivní	Variabilní
Laktóza	Pozitivní	Pozitivní	Variabilní
Mannitol	Negativní	Negativní	Negativní
Mannóza	Variabilní	Pozitivní	Pozitivní
Galaktóza	Pozitivní	Variabilní	Pozitivní

### 1.1.2 POHYB

*Capnocytophaga* spp. se může pohybovat klouzáním bez použití bičků, přičemž jako zdroj energie využívá protonovou hnací sílu. Po kontaktu s povrchem umožňuje klouzavá motilita migraci přes biologické bariéry, invazi hostitelské buňky a výstup z infikovaných buněk, čímž podporuje translokaci a systémové šíření (10; 17).

Ultrastruktura těchto „klouzavých“ bakterií byla pozorována pod elektronovým mikroskopem a tím bylo zjištěno, že buněčný povrch *C. sputigena* je pokryt fibrilami propojenými s buněčnou hmotou, zatímco *C. gingivalis* a *C. ochracea* měly odlišné chemické a fyzikální složení. U obou bakterií byly popsány adheziny, které zprostředkovávají koagregaci s různými dalšími orálními bakteriemi a které by mohli být použity pro adhezi a kolonizaci na kostech, kloubních náhradách, nebo na implantátech, či plastových pomůckách v medicíně. U *Capnocytophaga sputigena* byla popsána degradace laktoferinu C, která by mohla vyvolávat adhezi na epiteliální buňky, plazmatické proteiny a složky pojivové tkáně. V několika publikacích bylo také popsáno zapojení *Capnocytophaga* spp. ve vývoji dentálních biofilmů souvisejících s dentálním onemocněním – například zuby s velkým množstvím plaku vykazují vysoké hladiny *C. Gingivalis* (10; 7).

## 1.2 INTERAKCE S IMUNITNÍM SYSTÉMEM

Náš imunitní systém se dělí na imunitu vrozenou a získanou. Tyto systémy spolupracují na detekci a eliminaci cizorodých látek a patogenů, kontrole mikroflóry a podílejí se na udržení homeostázy v těle. Mikroorganismy si postupem času vyvinuly řadu strategií, jak se našemu imunitnímu systému vyhnout a stát se součástí mikroflóry nebo potenciálním patogenem. Náš kontakt s bakteriemi začíná pravděpodobně již během nitroděložního života a porodu a může být dvojího typu – zánětlivý a nezánětlivý (18).

Zánětlivý kontakt je, když bakterie překračuje bariéry hostitele a spouští imunitní odpověď. Nezánětlivá interakce je nejlépe doložena normální flórou a její interakcí lidským imunitním systémem. Zde musí být zachována určitá rovnováha a pokud se tato rovnováha naruší, například při poranění, užívání cytostatik nebo po léčbě antibiotik, může dojít k propuknutí onemocnění. Prozatím neexistují žádné důkazy, že by druhy *Capnocytophaga* měly potenciál působit invazivní infekce, pokud není porušena ochranná bariéra. Prasklina v kůži, která může být způsobena ostrým předmětem, nebo třeba zvířecími zuby, může vyvolat akutní vrozenou imunitní odpověď (19; 20).

V roce 2007 Shin et al. publikoval informace o zánětlivé odpovědi lidských a myších makrofágů v reakci na infekci *Capnocytophaga canimorsus* a *C. cytolegmi*. Údajně napadají a množí se v myších makrofágových buňkách J774.1 a jsou odolné vůči fagocytóze a usmrcení. Tato vlastnost závisí na přítomnosti bakteriální povrchově exponované sialidázy, která se účastní perzistence u experimentálně infikovaných myší. Makrofágy infikované *C. canimorsus* nejsou schopny uvolňovat IL-6 (interleukin 6), IL-8 (interleukin 8), interferon gamma a protein-1. Na rozdíl od *C. cynodegmi* může *C. canimorsus* také blokovat uvolňování oxidu dusnatého makrofágy. Má neobvyklou schopnost žít se hostitelskými buňkami, včetně fagocytů, způsobem závislým na povrchově exponovaných systémech pro hledání glykanu (10; 21; 22).

Lidský toll-like receptor 4 (TLR-4), což je protein, který zastává zásadní roli při rozpoznání patogenů a aktivaci vrozené imunity, je aktivován lipidem A, který reguluje prozánětlivou odpověď. *Capnocytophaga canimorsus* neinteraguje s TLR-4, ale živá bakterie *C. canimorsus* však může regulovat expresi TLR-4, takže není schopen aktivovat nukleární faktor kappaB. Některé kmeny *Capnocytophaga* mohou aktivovat produkci IL-1 (interleukin 1) z lidských periferních monocytů (21; 23).

Dá se tedy předpokládat, že *Capnocytophaga canimorsus* vykazuje několik silných imuno-únikových vlastností, které mohou přispívat k propuknutí vážných septických stavů pacientů (21).

### 1.3 CITLIVOST NA ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

K testování citlivosti na antimikrobiální látky se nejčastěji používají standardní diskové difuzní metody nebo kvantitativní diluční metody. Pro testování citlivosti *Capnocytophaga* spp. je metoda ETEST v současnosti považována za nejjednodušší a nejspolehlivější. U *Capnocytophaga* spp. nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi minimálními inhibičními koncentracemi získanými diskovou difuzní metodou a metodou ETEST. Se zaměřením na antibiotika běžně používaná k léčbě kostních infekcí je uváděno, že kmeny *Capnocytophaga* jsou rezistentní vůči kyselině fusidové, fosfomycinu, trimethoprimu a byly typicky citlivé na klindamycin, linezolid, tetracyklin, chloramfenikol, imipenem a na kombinace inhibitorů beta-laktamázy (24).

### 1.4 CAPNOCYTOPHAGA CANIMORSUS

*Capnocytophaga canimorsus* je součástí normální orální flóry psů a koček. Zvíře bývá zdrojem infekce člověka v 89,5 % a zbylých 10,5 % není zdroj infekce zjištěn. Studie v Japonsku zjistila 74% prevalenci v ústní dutině psů. Ačkoliv se bakterie vyskytuje také v ústní dutině koček, existuje jen velmi málo hlášených infekcí způsobených kočičím kousnutím – pravděpodobně kvůli menšímu poškození tkáně. Tato náročná gramnegativní, pomalu rostoucí bakterie je spojována se závažnými infekcemi zejména u pacientů s oslabenou imunitou (nejčastěji pacienti po splenektomii nebo při chronickém zneužívání alkoholu) Úmrtnost s infekcí způsobenou *C. canimorsus* se pohybuje mezi 25 a 30 % a je téměř dvojnásobná u pacientů, kde dojde k rozvoji septického šoku (25; 2; 26).

#### 1.4.1 HISTORIE

Mezi lety 1961 a 1975 bylo popsáno 17 případů nákazy neznámou bakterií, která se u všech pacientů projevovala horečkou. Deset z těchto pacientů potvrdilo, že před propuknutím příznaků bylo pokousáno psem a další čtyři byli v kontaktu se psem. Jako časté příznaky byly uváděny například zánět podkoží, endokarditida, meningitida a leukocytóza. 3 lidé na tuto tehdy neznámou nemoc zemřeli. Dvanácti pacientům bylo více než 40 let, nejmladší nakažený byl ve věku 17 let. Patnáct pacientů bylo ve špatném zdravotním stavu, nebo po operaci již před

propuknutím tohoto onemocnění (27). Vzorke byly testovány v laboratoři a všechny byly pozitivní na fenotypově podobný gramnegativní organismus, který byl klasifikován jako „dysgonický fermentor typu 2 (DF-2) Což znamená, že se jedná o pomalu rostoucí bakterii s fermentativním metabolismem (1; 16).

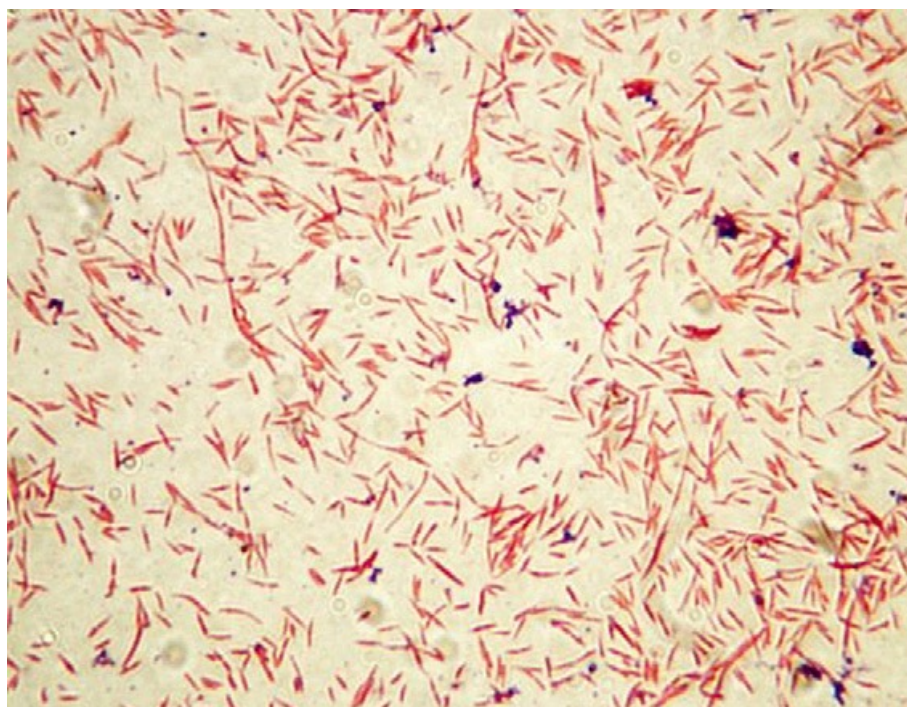
V roce 1989 Don J. Brenner geneticky a fenotypově charakterizoval DF-2 a „DF-2 podobné“ bakterie a navrhl pro ně názvy *Capnocytophaga canimorsus* a *C. cynodegmi* (16).

Od té doby bylo zjištěno, že infekce se vyskytuje po celém světě a případy byly hlášeny ze Spojených států, Kanady, Evropy, Austrálie i Jižní Afriky (27).

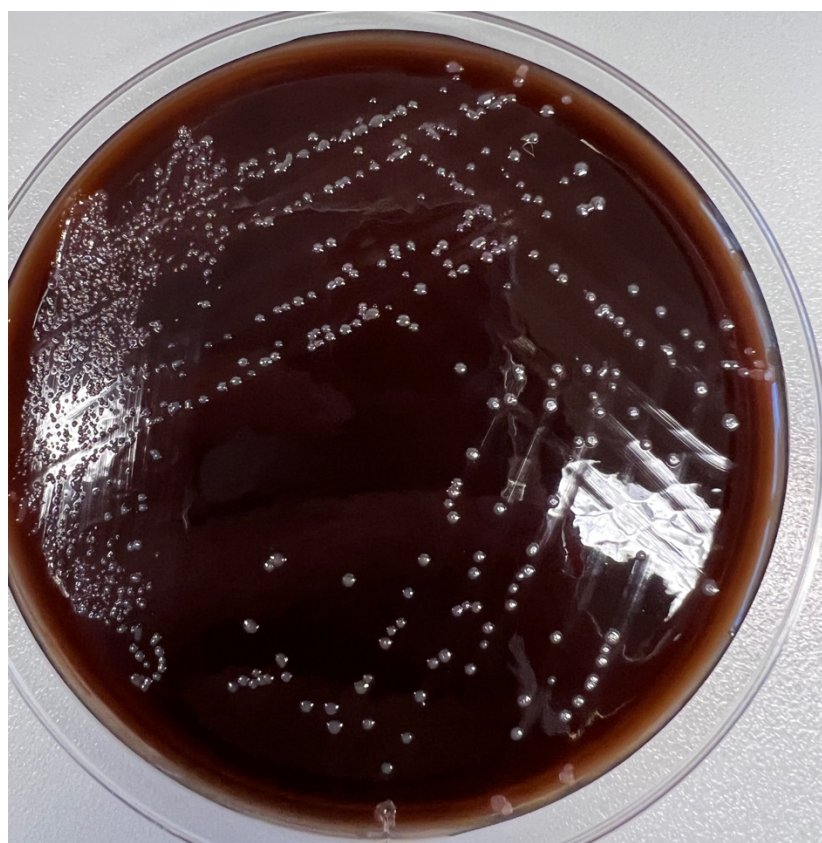
#### **1.4.2 MORFOLOGIE, KULTIVACE A IZOLACE**

Bakterie *Capnocytophaga canimorsus* jsou kapnofilní a mohou tedy žít pouze v prostředí, kde je koncentrace oxidu uhličitého vyšší než v atmosféře (nejméně 5 % CO<sub>2</sub>). Jsou to fakultativně anaerobní, pohyblivé gramnegativní tyčinky, které netvoří spory, nemají bičík a pohybují se „klouzavým“ pohybem, který nemusí být vždy patrný (27; 28).

Bakterie se poměrně dobře kultivují na krevním agaru s 5 % ovčí (Obr. 2) nebo králičí krve, na čokoládovém agaru nebo na Columbia agaru s 5 % beraní krve. Na MacConkey agaru bakterie neroste. Nejlépe roste v atmosféře obohacené o oxid uhličitý při teplotě 35-37 °C. Po 48 hodinách se tvoří nejčastěji úzké, ploché a hladké kolonie a průměru 1-2 mm. Mikroskopické pozorování (Obr. 1) ukázalo velký stupeň polymorfismu s variací velikosti a vzhledu v závislosti na kultivačních podmínkách. Tento polymorfismus se projevuje především v pozorování kolonií, které mohou mít na půdě různé barvy – fialovou, bílou, žlutou. Poté, co se seškrábnou z agaru, mají vždy barvu žlutou (27; 29).



**Obrázek 1** *Capnocytophaga canimorsus* pod mikroskopem obarvená dle Grama (27)



**Obrázek 2** Růst *Capnocytophaga canimorsus* na krevním agaru s 10 % beraní krve (Obrázek z archivu autora)

Biochemické testy se provádějí obtížně kvůli pomalému růstu mikroorganismu. *Capnocytophaga canimorsus* je kataláza, oxidáza, ONPG (O-nitrofenyl-β-D-galatosid) a arginindihydroláza pozitivní. Je negativní na ureázu, nitrát, indol, DNázu, lysin a ornitin (27).

### 1.4.3 PROJEVY ONEMOCNĚNÍ

V literatuře bylo popsáno více než 160 případů závažných infekcí *C. canimorsus*. Infikovaní pacienti byli pokousáni, poškrábáni nebo někdy jednoduše olíznuti psem nebo příležitostně kočkou (21).

Inkubační doba od kousnutí psem do nástupu systémových příznaků je asi 5 dní. Mezi dobou kousnutí a hospitalizací uplyne v průměru 7 dní (je uváděno rozmezí 1-14). Pacienti, kteří se dostaví na pohotovost do 8-12 hodin po kousnutí psem, mohou vykazovat lokální léze bez výrazných známek zánětu. V pozdějších stádiích může mít infekce příznaky jako lokalizovaná celulitida, bolest v místě poranění, hnisavý výtok a zánět lymfatických cév (27; 30; 31).

Počáteční příznaky septikémie jsou horečka (78 % pacientů), zimnice (46 %), myalgie (31 %), průjem (26 %), bolesti břicha (26 %), malátnost, dušnost, duševní zmatenost a bolesti hlavy. U imunokompromitovaných osob se může projevit velmi těžký průběh infekce, charakterizovaný sepsí, meningitidou, osteomyelitidou, peritonitidou, endokarditidou, pneumonií, diseminovanou intravaskulární koagulací (DIC) a fulminantní purpurou. DIC může vést k periferní gangréně horních a dolních končetin, rtů, nosu a uší. To vede často k nutné amputaci (27; 30; 32).

Purpura je skupina krevních onemocnění, které způsobují krvácení do tkáně z malých krevních cév, šok a multiorgánové selhání. Často jsou pod kůží nebo v ní jako drobné bodavé petechie. Byly popsány také hemolyticko-uremický syndrom a Waterhouse-Friderichsenův syndrom, který se projevuje šokem, diseminovanou intravaskulární koagulací (DIC), kožními lézemi, bilaterálními adrenálními hemoragiemi a sepsí (27; 32).

### 1.4.4 PATOGENITA A FAKTORY VIRULENCE

O patogenezi *Capnocytophaga canimorsus* toho není moc známo. Bylo popsáno, že se bakterie množí v myších makrofázích a je cytotoxická – pravděpodobně tedy produkuje toxin. *In vitro* byla pozorována velmi nízká úroveň produkce cytokinů (ve srovnání s *N. meningitidis*). Klinický průběh infekce *C. canimorsus* silně naznačuje, že bakterie je schopna se imunitnímu systému vyhýbat (alespoň v časných stádiích infekce). Absence prozánětlivé odpovědi je

způsobena skutečností, že *C. canimorsus* neinteraguje s lidským TLR4. Bakterie je nejen odolná proti fagocytóze a usmrcení, ale také blokuje usmrcení nepříbuzných bakterií makrofágy (21). Přestože je *Capnocytophaga canimorsus* klasifikována jako růstově náročná bakterie vykazuje robustní růst, když je v přímém kontaktu se savčími buňkami, včetně fagocytů (27; 22; 33). V několika případech byla popsána také schopnost této bakterie blokovat uvolňování oxidu dusnatého (22).

Další popsanou stabilní vlastností této bakterie je, že má sialidázovou aktivitu (22). Sialidáza, systematickým názvem acetylneuraminyl hydrolasa je enzym, který je schopen štěpit glykosidové vazby mezi terminální kyselinou sialovou a subterminální galaktózou v oligosacharidech, glykolipidech, glykoproteinech a v dalších substrátech. Patří mezi významné faktory virulence bakterií, virů i parazitů (34).

#### 1.4.5 DIAGNOSTIKA

V minulosti byla diagnostika *Capnocytophaga canimorsus* nejčastěji prováděna kultivací z krve. Méně často se pak využívalo jiných biologických materiálů jako je likvor nebo biopsie zasažené tkáně. Jelikož bakterie roste velmi pomalu, způsobovalo to závažné problémy v diagnostice a několik pozitivních případů tak nebylo vůbec odhaleno (21).

Za poslední roky se diagnostika *C. canimorsus* ale posunula dopředu. V současné době se standardně využívají postupy molekulární biologie, především polymerázová řetězová reakce (*polymerase chain reaction*, PCR) a sekvenace DNA. Při testování metodou PCR je však nutné věnovat pozornost látkám, které mohou reakci inhibovat. Inhibice byly například zjištěny v přítomnosti polyanethol sulfonátu sodného, který neutralizuje některá antibakteriální činidla v krvi, např. některé složky komplementu a antibiotika (3).

#### 1.4.6 LÉČBA

Jako antibiotikum první volby se používá penicilin G. Prozatím nebylo prokázáno, že by existoval nějaký kmen *C. canimorsus*, který by produkoval beta-laktamázu. Bakterie je dále citlivá na imipenem, klindamycin, chloramfenikol, cefalosporiny třetí generace, fluorchinolony, erytromycin, doxycyklin a metronidazol (3; 35).

Podle dostupných informací je bakterie rezistentní na aztreonam, polymyxin, fosfomycin, sulfametoxazol a aminoglykosidy (3).

Ještě před nasazením antibiotické terapie je důležité okamžité očištění rány a odstranění zbytků infikovaného oblečení. Systémové podávání antimikrobiálních látek se u zdravých lidí nedoporučuje. Lidem, kterým byla odstraněna slezina a prokáže se, že jsou infikováni bakterií



*Capnocytophaga canimorsus*, by měla být podávána profylaktická antibiotika. V některých zemích se však podávají systémová antibiotika všem, kteří byli pokousáni psem, kočkou nebo mají otevřenou ránu a byli v kontaktu se zvířecími slinami. Vzhledem k tomu, co vše může tato bakterie způsobit, je velmi důležitá včasná diagnostika a zahájení léčby v případě komplikací (3).

#### 1.4.7 RIZIKOVÉ SKUPINY

Největšímu riziku jsou vystaveni chovatelé zvířat a veterináři. Průzkum mezi veterináři v USA uvedl, že 65 % veterinářů utrpělo vážné zranění související se zvířaty, z nichž kousnutí a škrábnutí představovalo 38 % všech traumat (36).

*C. canimorsus* je primárně oportunní patogen, který infikuje jedince s oslabeným imunitním systémem. Většina infekcí u lidí se vyskytuje u osob starších 40 let, ale infekce byly hlášeny u pacientů ve věku 4 měsíců až 83 let, poměr mužů a žen je 3:1. Šedesát procent lidí, u kterých se projeví infekce mají určité predispozice k nákaze. Ti, kteří prodělali splenektomii, tvoří vysoce rizikovou skupinu s 30-60krát zvýšeným rizikem fatální septikémie. Často již 24 hodin od nástupu příznaků, mohou rozsáhlé infekce po splenektomii vyústit v rychle se zhoršující klinický průběh, který progreduje k selhání orgánů a smrti. Dalšími predisponujícími faktory pro rozvoj infekce jsou jaterní onemocnění způsobené užíváním alkoholu a užíváním kortizonu (36).

Za predisponující stavy jsou také považovány hematologické malignity, neutropenie a chronické plicní onemocnění. Až 40 % případů se však vyskytuje u dříve zdravých dospělých osob. Zneužívání alkoholu, asplenie, hematochromatóza,  $\beta$ -talasémie a kouření tabáku vedou k absorpci dvojnásobného množství železa z potravin než u normálních osob. Ve dvou případech imunokompetentních jedinců s infekcí *C. canimorsus* bylo výslovně zmíněno silné kouření. Alternativním vysvětlením, proč tyto stavy představují riziko pro infekci *C. canimorsus* je, že dvojnásobné zvýšení hodnot železa v séru mnohem lépe podporuje růst *C. canimorsus*. Předpokládá se, že přítomnost detekovatelného množství *C. canimorsus* pouze u jedné čtvrtiny psů a koček může být způsobena skutečností, že pozitivně testovaná zvířata mají v ústní dutině nedostatečné množství laktoferinu a dalších faktorů vázajících železo, toto je však některými studiemi vyvráceno a přetížení železem u člověka bylo pouze navrženo jako rizikový faktor v případě infekce *C. canimorsus* (27).

### 1.4.8 INFEKCE ZVÍŘAT

Není moc zpráv o infekci u jiných druhů než u lidí, kteří se nakazili po pokousání psem. V jednom případě byla bakterie vykultivována z infikovaného kousnutí králíka (Obr. 3) v zájmovém chovu a u druhého byla *C. canimorsus* izolována z infikovaného kousnutí u psa. Pes neměl bakteriémií, ale *C. canimorsus* byla z rány izolována ještě dva dny po primární izolaci. Oba případy měly ránu po kousnutí na hlavě (27).

Klinický syndrom u králíků po experimentální infekci *C. canimorsus* byl charakterizován diseminovanou intravaskulární koagulací, buněčnou nekrózou v orgánech, jako jsou ledviny a nadledvinky, kožní gangréna, trombocytopenie, hypotenze, hemoragická diatéza s purpurovými lézemi a petechiemi a selhání ledvin. V podstatě se jednalo o příznaky velmi podobné jako infekci probíhající u člověka (27).



**Obrázek 3** Infekce *Capnocytophaga canimorsus* u králíka po pokousání psem (27)

### 1.4.9 KONKRÉTNÍ PŘÍPADY ONEMOCNĚNÍ ČLOVĚKA

Anamnéza pacientky (59 let), přijaté na urgentním příjmu v Gdaňsku, zahrnovala asi tři dny progresivní slabosti, bolesti břicha a střevních potíží. Bylo zjištěno, že právě před třemi dny pacientku do ruky kousnul pes. Z historie chronických onemocnění byla zaznamenána pouze arteriální hypertenze a v jednu dobu také zneužívání alkoholu. Při příjmu byla pacientka při vědomí, udržovala verbální kontakt i když se u ní objevila hyperventilace, viditelná periferní

cyanóza, šok a koagulopatie. Pacientka měla rozsáhlé purpurové kožní léze pokrývající většinu těla (obr. 4). Bylo pozorováno také krvácení v místech zavedení periferních intravenózních kanyl. Výsledky laboratorních vyšetření potvrdili prvotní diagnózu septického šoku s průkazem mnohočetného orgánového selhání a koagulopatie. Z laboratoře bylo nahlášeno, že hemokultury vykazují gramnegativní tyčinky. I přes intenzivní péči se stav pacientky zhoršil a 16 hodin po přijetí došlo k zástavě srdce s asystolií. Z důvodu vyčerpání terapeutických možností byla pacientka prohlášena za mrtvou. Během standardní doby kultivace byla laboratorně potvrzena pouze přítomnost *Staphylococcus hominis* a až po pár dnech byla identifikována i *Capnocytophaga canimorsus* (37).



**Obrázek 4** Koagulopatické kožní léze (37)

Další případ je pacientka (41 let), která byla na urgentním příjmu přijata s pokousáním obličeje psem, ke kterému došlo 4 dny před příjmem. Vzhledem k počátečním pouze mírným potížím bez viditelného krvácení se pacientka nerozhodla vyhledat lékařskou pomoc ihned. O tři dny později začala cítit postižená místa, rozvinula se horečka a vyrážka s mramorovanou kůží na celých zádech. Lékařská anamnéza zahrnovala chronický alkoholismus s dlouhodobou abstinencí a obezitu. V nemocnici se u ní objevily známky syndromu systémové zánětlivé odpovědi, tachypnoe a horečka. Krátce po přijetí byla zahájena antibiotická léčba ciprofloxacinem a amoxicilinem/kyselinou klavulanovou. Tato kombinace nestačila a muselo

se přejít na fosfomycin, klindamycin a meropenem. Pacientka utrpěla multiorgánové selhání, které zahrnovalo oběhový systém, renální a jaterní insuficienci a diseminovanou intravaskulární koagulaci s jasnými známkami purpury (Obr. 5) (podobně jako v předchozím popsaném případě). Přes vysoké dávky antibiotik se její stav nelepšil. Nakonec pacientka utrpěla masivní hemodynamickou nestabilitu a zástavu srdce (25).

Před zahájením léčby se v hemokulturách nepodařilo identifikovat žádný patogen, který by mohl takto rozsáhlé poškození způsobit. Až teprve dvanáct dní po podávání antibiotik byla pomocí PCR identifikována bakterie *Capnocytophaga canimorsus*. V té době ale u pacientky začaly rozvíjet sekundární infekce kvasinkami a *Enterococcus faecium* (25).



**Obrázek 5** Nekrotická tkáň v místě kousnutí (25)

Několik infekcí bylo potvrzeno i v České republice. Například případ 74letého pacienta, který se 24. srpna 2020 přihlásil ke svému praktickému lékaři s tím, že poslední tři dny pociťuje bolest hlavy a ztuhlost šíje bez horečky. V den návštěvy mu teplota stoupla na 39 °C a začal pociťovat nevolnost. Jeho anamnéza zahrnovala diabetes mellitus II. Typu, arteriální hypertenzi a jaterní steatózu. Pacient byl kvůli přítomnosti horního meningeálního syndromu převezen na infekční oddělení. Kdy byla po provedených laboratorních vyšetřeních zahájena kombinovaná terapie intravenózním dexamethazonem a ceftriaxonem a pacient byl transportován na jednotku intenzivní péče do nemocnice Hradec Králové (38).

Mikroskopická a aglutinační analýza mozkomíšního moku byla první i druhý den negativní. Proto se přistoupilo k PCR testům, které pouze stanovily, že pozitivitu bakteriální DNA a zároveň vyloučili, že se nejedná ani o jednu ze známých bakterií, které způsobují meningitidy. Kultivace probíhala celkem sedm dní na Schaedlerově agaru (anaerobní komora s atmosférou obsahující 85 % dusíku, 5 % vodíku a 10 % oxidu uhličitého, teplota 37 °C) a teprve po sedmi dnech se začaly objevovat malé poloprůhledné kolonie mikroskopicky

tvořené gramnegativními malými tyčinkami. Kolonie byly podrobeny analýze na přístroji MALDI-TOF a díky tomu se podařilo identifikovat, že se jedná o bakterii *Capnocytophaga canimorsus*. Byla upravena antibiotická terapie a pacient se během 14 dní zcela zotavil. Po propuštění si vzpomněl, že ho jeho pes dva týdny před prvními příznaky kousnul do vnitřní strany bérce (38).

## 2 METODY VYUŽÍVANÉ K DETEKCI A IDENTIFIKACI

Metod, které se dají využít pro identifikaci bakterie *Capnocytophaga canimorsus* je celá řada. Od klasické kultivace, mikroskopie a biochemických testů se v posledních letech upustilo a mnoho výzkumů se věnuje vývoji rychlejší a spolehlivější metody, kterou by se dalo s jistotou určit, zda se jedná o pro člověka nebezpečnou *Capnocytophagu*, či nikoliv (6).

Jako nejvhodnější pro identifikaci jsou zcela jistě molekulárně biologické metody. Konkrétněji identifikace pomocí polymerázové řetězové reakce, či pomocí sekvenace nukleové kyseliny anebo také hmotnostní spektrometrie (39).

Metody molekulární biologie se využívají k přímému průkazu mikroorganismů pomocí detekce specifické sekvence nukleotidů v deoxyribonukleové nebo v ribonukleové kyselině. Na rozdíl od kultivačních metod, které pro úspěšnou kultivaci vyžadují živý a metabolicky aktivní mikroorganismus, si molekulární mikrobiologie vystačí i s menším množstvím usmrcených mikrobů (40).

### 2.1 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie patří v současné době k běžně používané analytické metodě v klinických laboratořích po celém světě. Lze ji využít pro identifikaci i kvantifikaci sloučenin nebo pro studium jejich struktury a reaktivity (41).

#### 2.1.1 MALDI

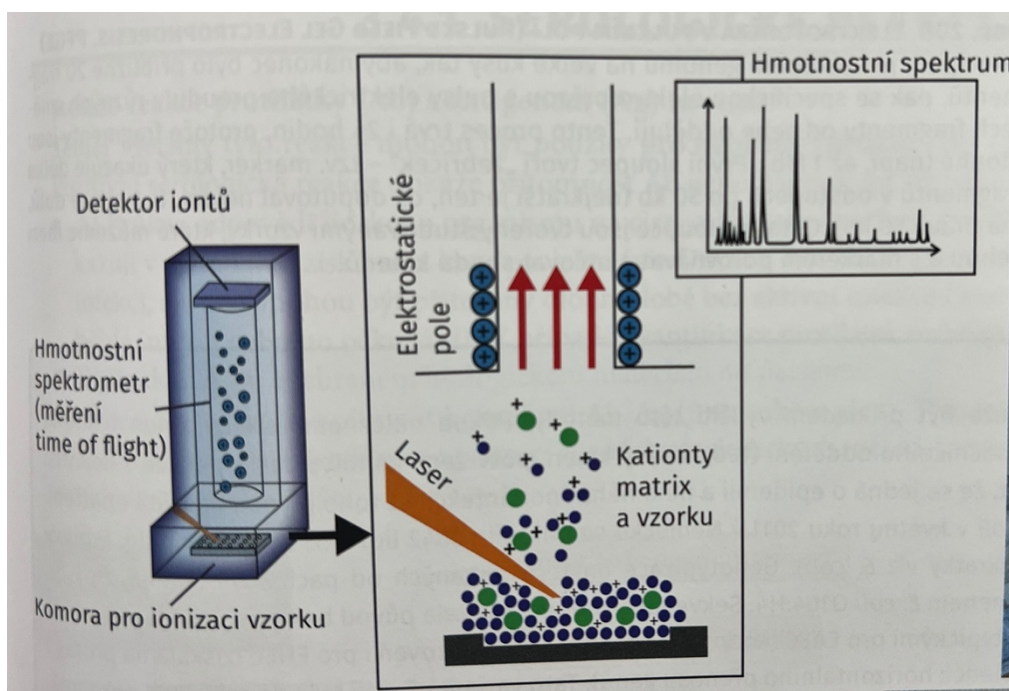
Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (Matrix-assisted laser desorption/ionisation), zkráceně MALDI, je jedna z nejpoužívanějších metod hmotností spektrometrie aplikovaných k identifikaci mikroorganismů v klinických vzorcích a oproti předchozím metodám využívá analýzu a profilování proteinů (42; 43).

Tato aplikace se ukazuje jako užitečná při diagnostice a léčbě infekčních chorob, které vyžadují rychlou identifikaci. MALDI se nejčastěji používá v kombinaci s detektorem doby letu (Time of flight, TOF) a společně tvoří komerčně dostupné zařízení. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF je pohodlná, rychlá, velmi přesná a zároveň nákladově efektivní. Není divu, že tato metoda způsobila revoluci v mikrobiální identifikaci v klinických laboratořích (42; 44).

Vývoj mikrobiologické identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie začal v 70. letech 20. století, kdy byla k identifikaci mikroorganismů použita plynová chromatografie. V roce

1988 byla vyvinuta měkká laserová desorpce – tato technologie zahrnuje ionizaci proteinů, aniž by je nějakým způsobem poničila. Díky této měkké ionizační technice, která významně přispěla k rozvoji MALDI byla jejímu vynálezci, Koichi Tanakovi, udělena v roce 2002 Nobelova cena za chemii. V roce 1994 bylo prokázáno, že profilování proteinu MALDI-TOF s použitím kyseliny  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicové jako matricového materiálu bylo užitečné pro rychlou identifikaci bakterií. V té době se však používali již předem upravené mikroorganismy. Díky dalším inovacím lze v současné době bakteriální kolonie aplikovat přímo na speciální destičku bez jakékoliv předchozí úpravy (42; 45).

Proces MALDI lze shrnout poměrně jednoduše (Obr. 6): Nejprve je vyzolovaná kolonie přenesena na vzorkovou destičku, která je později vystavena laserovému ozáření. Po přidání a vysušení matrice se destička vloží do hmotnostního spektrometru. Destička je poté ozářena pomocí laseru a proteiny v bakteriálních buňkách (především ribozomální proteiny) jsou ionizovány. Čas potřebný k tomu, aby tyto proteiny doletěly k detektoru, určuje poměr hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) proteinů složky a intenzita signálu poskytuje hmotnostní spektrum. Takto získané hmotnostní spektrum se poté porovnává se spektry v referenční databázi. Metoda MALDI-TOF dokáže zkrátit proces identifikace přibližně o jeden den a umožňuje tak rozpoznat mikroorganismy v časnějším stádiu, což může vést k rychlejší diagnostice. Přesto je čas identifikace založen na rychlosti růstu jednotlivých mikroorganismů (42; 24).



Obrázek 6 Princip MALDI-TOF metody (4)

### **2.1.1.1 IDENTIFIKACE *CAPNOCYTOPHAGA CANIMORSUS* POMOCÍ MALDI - TOF**

Pro téměř 5700 buněčných organismů existuje jedna databáze, která má zaznamenaná jejich spektra. Tato knihovna se jmenuje MALDI BioTyper a obsahuje také 27 kmenů patřících k sedmi druhům rodu *Capnocytophaga*. Databáze do roku 2016 neobsahovala téměř žádné spektrum izolátu *Capnocytophaga canimorsus* a *C. cynodegmi*. V roce 2016 se podařilo izolovat 51 kmenů *C.canimorsus* za účelem vytvoření doplňkové referenční databáze. Podle specifikací výrobce je pro identifikaci na úrovni druhu vyžadováno skoré (na základě tohoto parametru se hodnotí pozitivita vzorku) vyšší nebo rovno 2 a pro identifikaci na úrovni rodu skoré mezi 2 až 1,7. Nižší skóre je považováno za nespolehlivé pro identifikaci. Dosažení skóre 2 se nakonec podařilo a databáze BioTyper aktuálně poskytuje spolehlivou identifikaci na úrovni druhu (42; 44).

## **2.2 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY**

Metody molekulární biologie se již běžně využívají v mikrobiologické a epidemiologické praxi. Tyto metody jsou velmi rychlé a umožňují získat výsledek již za několik hodin. Velkou výhodou je, že umožňují detekovat a identifikovat viry, které není možné izolovat na buněčných kulturách a bakterie, které se velmi těžko kultivují na běžně dostupných diagnostických půdách (46; 47).

Molekulárně biologické metody se řadí mezi přímé diagnostické metody společně s mikroskopií, elektronovou mikroskopií, izolací, kultivací a detekcí antigenů. Spektrum využívaných molekulárně biologických metod v je v České republice velmi různorodé – od metod neamplifikačních (například hybridizace) po metody, které využívají amplifikaci nukleové kyseliny. Amplifikační metody, které dokážou zmnožit nukleovou kyselinu, jsou efektivní, a především extrémně citlivé a mohou tak detekovat viry nebo bakterie, které se ve vzorku vyskytují jen ve velmi malém množství a jinými metodami by nebylo možné je prokázat (46).

### **2.2.1 IZOLACE NUKLEOVÉ KYSELINY**

Izolace nukleových kyselin je základním a často výchozím bodem pro všechny další experimenty v biomedicinském výzkumu a jedná se nejdůležitější krok v jakémoliv molekulární technice (48).

V minulosti býval proces extrakce a purifikace komplikovaný, časově náročný, pracný a omezený. V současné době existuje mnoho specializovaných metod, které lze použít



k extrakci čistých biomolekul. Extrakce DNA a RNA se řídí protokoly se standardizovanými činidly, z nichž mnohé jsou k dispozici v komerčních soupravách s kontrolou kvality. Bez ohledu na protokol vyžaduje úspěšná extrakce nukleové kyseliny z biologických tkání dostatečné narušení tkáně a buněčných struktur, denaturaci komplexů nukleoproteinů, inaktivaci nukleáz a purifikaci nukleových kyselin. Všechny tyto kroky lze upravit na míru podle požadované nukleové kyseliny a zdroje biologického vzorku (49; 50).

Mnoho z technik bylo upraveno do komerčně dostupných souprav, které urychlují celý proces a nesou menší zdravotní rizika při manipulaci se vzorky. Základní kroky izolace DNA zahrnují narušení buněčné struktury za vzniku lyzátu, separaci rozpustné DNA z buněčného odpadu a jiného nerozpustného materiálu a purifikaci požadované DNA z rozpustných proteinů (49; 51; 52).

RNA i DNA lze izolovat z různých typů vzorků, včetně periferní krve, aspirátu kostní dřeně, čerstvé nebo zmražené tkáně, amniocytů, kultivovaných buněk, buněk z nejrůznějších výtěrů a jiné. Přestože kvalita a množství extrahované nukleové kyseliny z jakéhokoliv biologického materiálu závisí na množství a integritě primárního materiálu, jsou současné metody optimalizovány pro velké výnosy a vysokou čistotu. Dnešní technologie by měla umožnit vysoký výtěžek, čistotu, reprodukovatelnost, rychlost, přesnost a spolehlivost. Zároveň by se mělo minimalizovat riziko křížové kontaminace (49; 51)

### **2.2.2 SEKVENOVÁNÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN**

Sekvenace se provádí s cílem stanovení primární struktury nukleových kyselin – určení sekvence bází (nukleotidů). V průběhu let byly postupně vyselektovány dva základní metodické přístupy:

- 1) Chemické (Maxamovo-Gilbertovo) sekvenování
- 2) Enzymatické (Sangerovo) sekvenování

Chemické sekvenování vždy začíná přípravou koncově radioaktivně nebo fluorescenčně značených molekul DNA a jejich denaturací za vzniku jednořetězcových fragmentů. Směs, která je značena polynukleotidem je rozdělena do čtyř paralelních vzorků a v každém z nich jsou přednostně chemicky modifikovány jeden nebo dva typy bází. K modifikaci bází dochází náhodně v rámci polynukleotidu. Zároveň tato modifikace oslabuje chemické vazby řetězce a přednostně vede ke štěpení řetězce působením další chemické látky. Tímto procesem jsou získány fragmenty, jejichž délka odpovídá vzdálenosti modifikované báze od značeného konce

molekuly. Ty jsou poté separovány gelovou elektroforézou za denaturačních podmínek a v gelu jsou detekovány dle způsobu značení, které bylo provedeno na začátku celého procesu (39).

Po čase bylo chemické sekvenování vytlačeno sekvenováním enzymatickým. Metoda enzymatického sekvenování je založena na principu replikace DNA, jejíž sekvenci poté zjišťujeme, a která je použita jako matrice pro syntézu komplementárního řetězce DNA polymerázou. Vzorek je stejně jako u chemické sekvenace rozdělen na čtyř části a do každé je přidán vždy jeden značený deoxyribonukleotid (dNTP) a jeden ze čtyř dideoxyribonukleotidů (ddNTP). ddNTP jsou analogy dNTP, jen s rozdílem, že postrádají 3'-OH skupinu., na kterou by mohla DNA polymeráza připojit další dNTP. ddNTP fungují tedy jako koncové inhibitory syntézy DNA řetězce a v místě jejich začlenění tedy dochází k zástavě syntézy komplementárního řetězce. Výsledkem této reakce je směs různě dlouhých fragmentů, které jsou v koncové fázi opět separovány gelovou elektroforézou a za denaturačních podmínek detekovány (39; 40).

Další metodou, která se novodobě používá je tzv. pyrosekvenování. Obdobně, jako v případě enzymatického sekvenování je i tato metoda založena na syntéze DNA. Liší se však způsobem, jakým se detekuje nově začleněný nukleotid. Velmi zjednodušeně se jedná o kaskádu enzymatických reakcí, při kterých dochází v konečné fázi k uvolnění energie světla (53).

V posledních pár letech byly metody sekvenování velmi zmodernizovány a zefektivněny. Souhrnně se novým metodám říká nová generace sekvenování. Tyto metody jsou výrazně levnější a umožňují sekvenovat rozsáhlé úseky DNA, včetně celého lidského genomu, během několika dnů. Přestože se jednotlivé sekvenátory v některých faktorech zásadně liší, jsou atributy, které mají společné (54):

- Náhodná fragmentace DNA templátu, ligace s adaptorovými sekvencemi a vytvoření knihovny
- Purifikační a amplifikační kroky
- Možnost současně provádět až několik stovek milionů sekvenačních reakcí
- Využití digitálního čtení umožňující kvantifikaci (55).

### 2.2.2.1 PRAKTICKÉ VYUŽÍTÍ

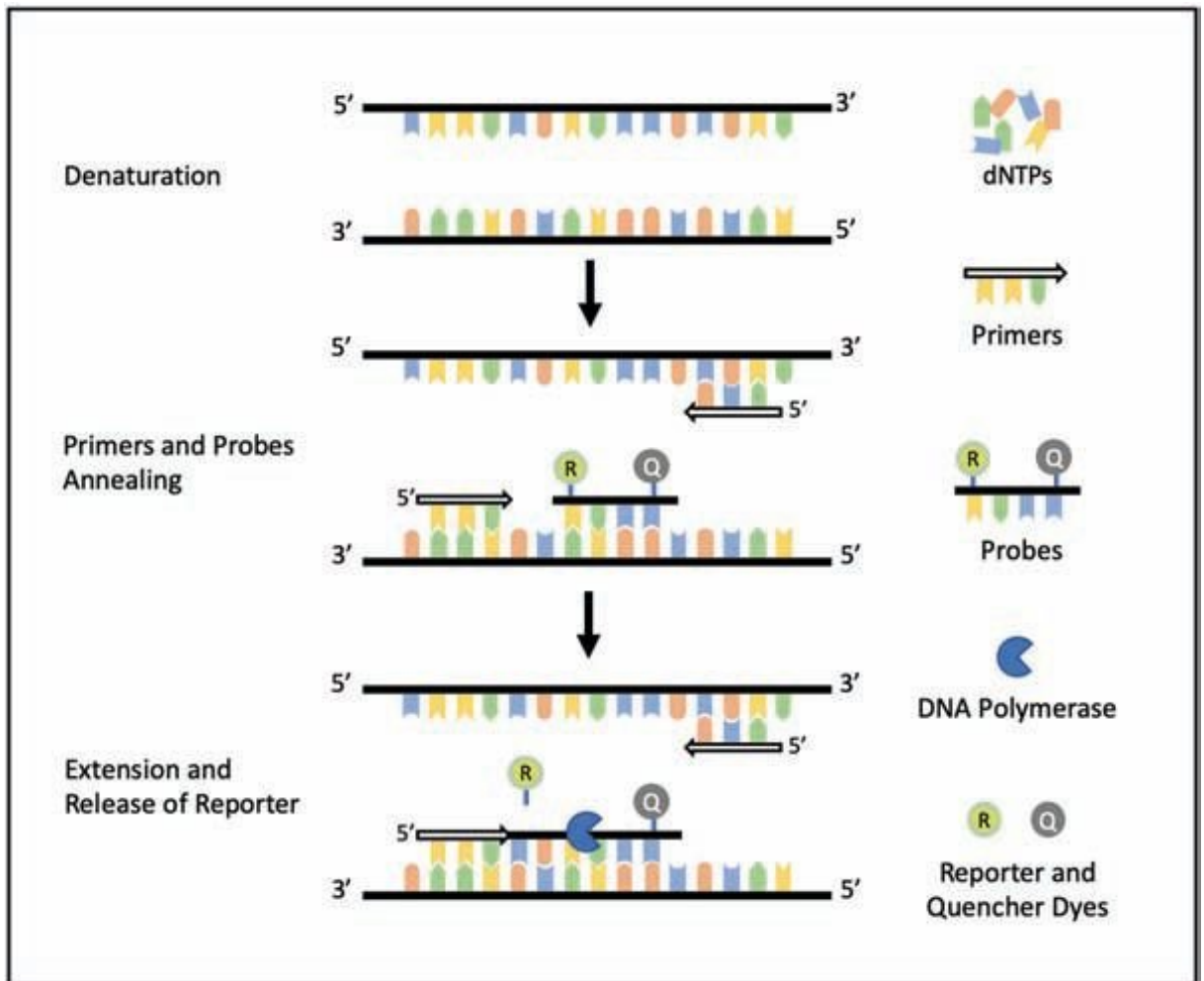
Kromě nejrůznějších výzkumných projektů bývá sekvenování často využíváno v lékařské genetice. Například při určení bližší charakteristiky nádorového onemocnění – mutací genů rakoviny prsu *BRCA1* (Breast cancer gene 1) a *BRCA2* (Breast cancer gene 2) a

podobné. Sekvence nové generace využíváme v oblasti molekulárně biologického výzkumu, k identifikaci nových druhů mikroorganismů a také například umožňuje porovnávat genom rakovinné buňky s normálním genomem u jednotlivých pacientů (39). Nově se dokonce povedlo osekvenovat celý lidský genom, což vede k lepšímu pochopení, jak se lišíme nejen od ostatních lidí, ale také od dalších organismů. Mezi nově sekvenovanými geny jsou například geny, které jsou zodpovědné za imunitní reakce, pomáhají nám přizpůsobit se a přežít různé infekční onemocnění (56; 57).

### 2.2.3 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

V současné době se jedná o nejvýznamnější a nevyužívanější molekulární metodu. Ta umožňuje amplifikovat nukleovou kyselinu i z velmi malého množství materiálu. Od svého vývoje na počátku 80. let byla základní polymerázová řetězová reakce přizpůsobena široké škále úkolů v molekulárním klonování, včetně sekvenování DNA, *in vitro* mutagenese, detekce mutací, klonování cDNA a genomové DNA a alelotypizace. PCR využívá teplotní cyklování k zahájení a ukončení syntézy DNA katalyzované enzymem. Každý cyklus se skládá ze tří fází popsaných také na obrázku 7 (58; 4; 59):

1. Denaturace templátové DNA (obvykle teplota vyšší než 90 °C).
2. Nasedání dvou syntetických oligonukleotidových primerů na denaturovanou templátovou DNA: Tyto primery, obvykle o délce 20-25 nukleotidů, jsou navrženy s využitím již existujících znalostí sekvence DNA templátu. Jsou komplementární k sekvencím na opačných vláčkách cílové DNA. Vazebná místa pro primery mohou být oddělena několika nukleotidy nebo i tisíci.
3. Extenze, při které je zahájena syntéza DNA na 3' koncích navázaných primerů: K prodloužení primerů dochází při teplotách mezi 55 °C a 70 °C v enzymatické reakci katalyzované termostabilní DNA polymerázou (58).



**Obrázek 7** Grafické znázornění všech kroků polymerázové řetězové reakce (4)

Tento proces, který se opakuje asi 25-35krát a probíhá v přístroji, který je označován jako thermocycler (Obr. 8), což je programovatelné zařízení, které řídí teplotu a čas každého kroku v cyklu. Produkty prvního kola syntézy jsou dva dceřiné řetězce DNA, které pak působí jako templáty pro další kolo syntézy DNA řízené primery. Kopie cílové sekvence se zdvojnásobují během každého cyklu. Namnožená DNA se může vizualizovat a prokázat například fluorescenční genovou sondou (58; 4).



**Obrázek 8** Thermocycler od firmy BIO-RAD (Obrázek z archivu autora)

PCR dokáže amplifikovat i RNA – poté se tedy hovoří o PCR spojené s reverzní transkripcí. Ribonukleová kyselina musí být přepsána do komplementární cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Až poté může být pomocí PCR zmnožena (60).

V molekulární biologii se používají různě modifikované verze polymerázové řetězové reakce.

- **Hot-start PCR:** Využívá tzv. hot-start polymerázu, která vyžaduje aktivační teplotu okolo 95 °C. Během nízkých teplot při zahřívání vzorku na teplotu počáteční denaturace mohou nespecificky nasedat primery na templátovou DNA a tím vznikat nespecifické produkty. Enzym, který se využívá pro hot-start PCR je za nízkých teplot neaktivní a odpadá tedy riziko vzniku PCR produktu z nespecificky nasednutých primerů (61).
- **Touchdown PCR:** V počátečních cyklech je teplota nasedání primerů vysoká, čímž se zabrání nespecifickému nasedání primerů, ale postupně se s dalšími cykly snižuje (62).
- **Nested PCR:** Používá se jeden pár vnějších primerů a jeden pár vnitřních primerů. Vnitřní primery nasedají na sekvenci, která je ohraničena těmi vnějšími (63).

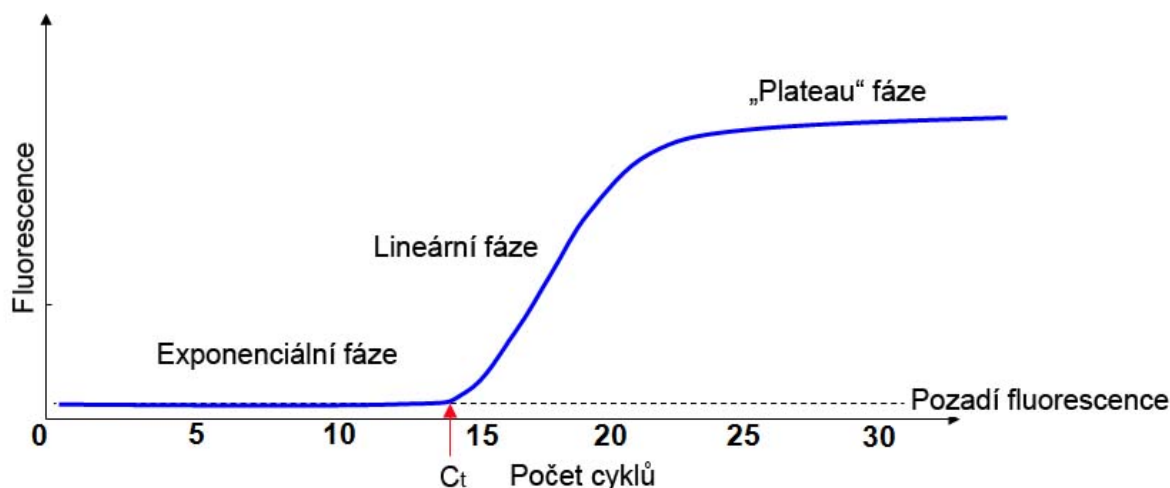
- **Inverzní PCR:** Využívá se pro identifikaci neznáme sekvence, kde uvnitř leží sekvence známá (58).
- **Asymetrická PCR:** Slouží k produkci jednoho vlákna – je vhodná především pro sekvenování (58).
- **Multiplex PCR:** Využívá více než jeden pár primerů, které se navážou k různým úsekům DNA. Vzniká více různých produktů (58).
- **Kvantitativní real-time PCR:** Metoda kvantifikace DNA.

Tato práce se podrobně zabývá pouze klasickou PCR s detekcí na agarózovém gelu a metodou PCR v reálném čase.

#### 2.2.4 REAL-TIME PCR (RQ-PCR, qPCR)

Tato metoda slouží pro zjištění množství nukleové kyseliny ve vyšetřovaném vzorku. Je to tedy kvantifikační reakce – proto název qPCR (quantitative PCR). Kromě odpovídajících primerů musí být přítomna ještě sonda. Ta je buď fluorescenčně značená a hybridizuje s amplifikovaným vláknem podobně jako primery, nebo se jedná o barvivo se schopností vmezeřit se mezi dvouvláknovou DNA. Fluorescenční signál ze sondy narůstá se zvyšujícím se množstvím amplifikované nukleové kyseliny (58; 4).

Čím více nukleové kyseliny vstupuje do reakce, tím dříve bývá dosaženo detekčního prahu pro fluorescenci a amplifikace je tedy dříve detekovatelná (Obr. 9). Signál, který je emitovaný sondou se pak hodnotí ve vztahu k počtu proběhlých cyklů PCR. První cyklus, kdy je možné namnoženou nukleovou kyselinu detekovat, je označován jako tzv. prahový cyklus. Kvantitativní vyhodnocení pak probíhá tak, že se porovná prahový cyklus vyšetřovaného vzorku s prahovými cykly kalibrační křivky (4; 64).



**Obrázek 9** Jednoduchý graf znázorňující sílu fluorescenčního signálu detekovaného na přístroji pro real-time PCR (73)

#### 2.2.4.1 ZÁKLADNÍ SOUČÁSTI PCR

Aby reakce fungovala správně tak, jak má, jsou k tomu zapotřebí nedílné komponenty. Ty jsou nejčastěji dodávány v komerčně dostupných soupravách (65).

##### Termostabilní DNA polymeráza pro katalýzu templátově závislé syntézy DNA

V současné době je k dispozici široký výběr enzymů, které se liší svou účinností a schopností syntetizovat velké produkty DNA. Pro rutinní PCR je enzymem první volby Taq polymeráza, která byla poprvé izolována z bakterie *Thermus aquaticus*. Specifická aktivita většiny komerčně dostupných Taq polymeráz je 80 000 jednotek/mg proteinu (58).

##### Pár syntetických oligonukleotidů pro primární syntézu DNA

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují účinnost a specifitu amplifikační reakce, avšak ten nejdůležitější je správný návrh oligonukleotidových primerů, který vede k získání produktů ve vysokém výtěžku a k potlačení amplifikace nežádoucích sekvencí. Typicky se používá 0,1- 0,5  $\mu\text{M}$  od každého primeru (58).

##### Deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP)

Pro Taq polymerázu se doporučují koncentrace 200-250  $\mu\text{M}$  každého dNTP. Reakce s koncentracemi dNTP již 20  $\mu\text{M}$  jsou schopny generovat 0,5-1,0 pmol jediného amplifikovaného fragmentu o délce 1 kb. Vysoké koncentrace dNTP mohou však způsobovat inhibice. Některé dNTP mohou obsahovat pyrofosfáty, které mohou inhibovat PCR. Mnoho výrobců proto prodává deoxynukleosidtrifosfáty purifikované pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, aby se inhibicím předešlo. Zásobní roztoky dNTP jsou citlivé na zmrazování a rozmrazování. Pokud se rozmrazují a zmrazují často, snižuje se tím účinnost

PCR. Aby se předešlo problémům, doporučuje se skladování při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v malých alikvotech (58; 66).

#### Dvojmocné kationty

Všechny termostabilní DNA polymerázy vyžadují pro svou aktivitu volné dvojmocné kationty, obvykle to bývají  $\text{Mg}^{2+}$ . Některé polymerázy pracují i s pufrý obsahujícími manganaté ionty, avšak méně efektivně. Ionty vápníku jsou zcela neúčinné. Hořečnaté ionty mají v PCR dvě funkce: reakci s dNTP za vzniku komplexů, které jsou substráty pro Taq polymerázu a stabilizaci komplexů primer-templát. Když je koncentrace  $\text{Mg}^{2+}$  nízká, primery neefektivně nasedají na templátovou DNA a když je příliš vysoká, párování bází se stabilizuje do takové míry, že duplexy vzniklé během amplifikace jsou neefektivně denaturovány zahříváním. Optimální koncentrace hořečnatých iontů musí být stanovena empiricky zvlášť pro každou kombinaci primerů a templátu (58).

#### Pufr pro udržení pH

Nejčastěji je využíván Tris-Cl, upravený na hodnoty pH mezi 8,3 a 8,8 při laboratorní teplotě. Během inkubace při  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  klesne pH reakční směsi o více než celou jednotu a vznikne tak pufr, jehož pH je 7,2 (58).

### **2.2.5 VÝHODY A NEVÝHODY MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICÝCH METOD**

Mezi největší výhody rozhodně patří možnost detekovat mikroorganismy, které jsou nekultivovatelné nebo ke svému růstu potřebují náročné podmínky. Dále jsme pomocí těchto metod schopni od sebe rozlišit nejen bakteriální druhy, které jsou si fenotypově velmi podobné, ale i popsat mikroorganismy o dost detailněji a rozlišit různé kmeny a také mutace v rámci jednoho mikroorganismu. Jako další neméně významné výhody se jeví vysoká senzitivita vyšetření, kdy jsme schopni zachytit mikroby i ve vzorku, ve kterém se nachází jen ve velmi malém množství. S tím se také ale zároveň pojí první nevýhoda těchto vyšetření. Kvůli vysoké senzitivitě můžeme zajistit i mikroorganismy v nízkých počtech, které nemají příčinnou souvislost s onemocněním (40; 4).

Rychlost provedení je další faktor, díky kterému jsou tyto specializovaná vyšetření čím dál tím více vyhledávána. Pokud se jedná o PCR vyšetření, tak v některých případech můžeme mít výsledek již do dvou hodin (58).

Jako nevýhody jsou nejčastěji uváděny rizika spojená s falešnou pozitivitou výsledků a nemožnost zjištění rezistence bakterií k antibiotikům, protože nepracujeme s živými mikroby. K falešně pozitivním výsledkům může nejčastěji dojít kontaminací DNA nebo RNA (39).





### 3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo zavedení a optimalizace molekulárně biologické metody pro detekci *C.canimorsus* ve vzorcích orálních stěrů psů a koček.

Dílčí kroky byly následující:

- 1) Průkaz *Capnocytophaga canimorsus* metodou PCR
- 2) Zavedení a optimalizace RT-PCR pro sbírkový kmen *C. canimorsus*
- 3) Sběr vzorků výtěrů z dutiny ústní psů a koček
- 4) Aplikace PCR a RT-PCR na reálné vzorky
- 5) Kultivace a izolace *Capnocytophaga canimorsus*
- 6) Identifikace vyizolovaných živých buněk *C.canimorsus*

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

- Analytické váhy, KERN, Německo
- Autokláv (parní sterilizátor) PS 20 A, BMT, ČR
- Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 5104, BMT, ČR
- Elektroforetická vana EASYCAST B1A, Sigma, USA
- Elektroforetický zdroj EC 250-90, Sigma USA
- Laminární box, Thermofisher, USA
- Lednice s mrazákem -20 °C, Liebherr, Švýcarsko
- Mikrovlnná trouba, LG, Jižní Korea
- Mikroskop, Nikon, Japonsko
- Minicentrifuga, Eppendorf, Německo
- PDA UV-VIS Spektrofotometr, RMI s.r.o., Česká republika
- Vortex, VELP Scientifica, Itálie
- Termoblok SBH130DC, (Stuart®, UK)
- Termostat, SalvisLab Biocenter, Švýcarsko
- Thermocycler TProfessional, Biometra, Německo
- Thermocycler CFX 96, Bio-Rad, USA
- UV dekontaminační box UVC/T-AR, Biosan, Litva
- UV transluminátor, Vilber lourmat, Francie

#### Software

- Bio-Capt verze 11.02, Vilber lourmat, Francie
- BioRad CFX Maestro, BioRad, USA
- Microsoft Office – Word, Excel, Powerpoint, Microsoft, USA

### 4.2 LABORATORNÍ POMŮCKY

- Skleněné zkumavky, stojánky na zkumavky, kovová víčka, Petriho misky, plastové špičky s filtrem, automatické pipety, kahan, očkovací kličky, Erlenmayerovy baňky, plastové odpadní pytle na biologický odpad, mikrozkušavky typu Eppendorf 1,5 ml, plastové stripy a víčka na qPCR

## 4.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA

### Krevní agar, HiMedia, Indie

#### Složení:

- Proteózový pepton 15 g/l
- Játrový extrakt 2,5 g/l
- Kvasnicový extrakt 2,5 g/l
- Chlorid sodný 5 g/l
- Agar 14 g/l
- Konečné pH by mělo být  $7,3 \pm 0,2$
- Beraní krev 100 ml/l
- Gentamicin 20 mg/l

Příprava: V 1 litru sterilizované destilované vody se rozpustilo 40 g dehydratovaného media. Médium se sterilizovalo v autoklávu při 120 °C po dobu 15 minut. Do ochlazeného základu se přidalo 10 % sterilní beraní krve a antibiotikum gentamicin. Médium se rozplnilo do Petriho misek, nechalo vychladnout a skladovalo v lednici po dobu maximálně jednoho měsíce.

Příprava gentamicinu (Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové): Antibiotikum se rozpustilo ve sterilní destilované vodě, připravil se zásobní roztok, který se přidával ke krevnímu agaru vychlazenému na 50 °C tak, aby výsledná koncentrace byla 20 µg/ml a později 40 µg/ml.

### Mueller-Hintonův bujón, HiMedia, Indie

#### Složení:

- Dehydratovaná masová infúze 2 g/l
- Kaseinový hydrolyzát 17,5 g/l
- Škrob 1,5 g/l
- Konečné pH by mělo být  $7,3 \pm 0,1$

Příprava: V 1 litru sterilizované destilované vody se rozpustilo ve 25 g dehydratovaného média a sterilizovalo v autoklávu při 120 °C po dobu 15 minut.

### Amiesova půda s aktivním uhlím, COPAN, Itálie

Jedná se o sterilní tampon ze syntetické bavlny ve zkumavce s transportním médiem obohaceným o aktivní uhlí.

## **ESwab Liquid amies, COPAN, Itálie**

Balení obsahuje sterilní tampon ze syntetické bavlny a zkumavku s tekutým transportním médiem, které umožňuje automatickou eluci vzorku do tekutého média.

## **4.4 REAGENCIE K PROVEDENÍ MORFOLOGICKÝCH TESTŮ**

### **96% ethanol**

### **Aceton**

### **Činidlo pro oxidázu, BioMérieux, Francie**

### **Fyziologický roztok**

Složení:

- Chlorid sodný            8,5 g
- Destilovaná voda      1 l

Příprava: 8,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody. Vzniklý roztok byl autoklávován při 120 °C po dobu 15 minut.

### **Karbofuchsin**

Složení:

- Bazický fuchsin            1 g
- 96% ethanol                10 ml
- 5% vodní roztok fenolu    100 ml

Příprava: Smícháním vznikla suspenze, která byla po filtraci zředěna destilovanou vodou v poměru 1:10

### **Krystalová violet'**

Složení:

- Krystalová violet'        5 g
- 96% ethanol                220 ml
- 1% oxalacetát amonný

Příprava: Smícháním 20 ml roztoku, který vznikl rozpuštěním 5 g krystalové violeti ve 220 ml 96% ethanolu a 80 ml 1% oxalacetátu amonného vznikla suspenze, která se před použitím zfiltrovala.

## **Lugolův roztok**

### Složení:

- Jód 1 g
- Jodid draselný 2 g
- Destilovaná voda 300 ml

Příprava: Roztok vznikl rozpuštěním jódu a jodidu draselného v destilované vodě.

## **Peroxid vodíku pro katalázu**

## **4.5 REAGENCIE K PROVEDENÍ PCR**

**Agaróza použita k provedení elektroforézy**, Top-Bio, Česká republika

1,2 g agarózy bylo rozpuštěno v 80 µl 1% TBE (Tris-Borát-EDTA) pufru

**Ethidium bromid**, Top-Bio, Česká republika

10 mg/ml v PCR vodě

**DNA marker 155-970 coloured**, Top-Bio, Česká republika

**PPP Master mix**, Top-Bio, Česká republika

Složení: Tris-HCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, MgCl<sub>2</sub>, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Taq DNA polymeráza, barvivo, stabilizátory a aditiva

**Primery**, Generi Biotech, Česká republika

CaL2 forward 5'-GTAGAGTGCTTCGGCACTTG-3'

CaR reverse 5'-GCCGATGCTTATTCATACA-3'

## **4.6 REAGENCIE K PROVEDENÍ REAL-TIME PCR**

**Eluční pufr AE**, QIAGEN, Německo

**96% ethanol**

**Lyzační pufr AL**, QIAGEN, Německo

**Primery**, Generi Biotech, Česká republika

CaL2 forward 5'-GTAGAGTGCTTCGGCACTTG-3'

CaR reverse 5'-GCCGATGCTTATTCATACA-3'

**Promývací pufr AW1**, QIAGEN, Německo

**Promývací pufr AW2**, QIAGEN, Německo

**Proteináza K**, QIAGEN, Německo

#### **qPCR 2x SYBR Master Mix, Top-Bio, Česká republika**

Složení: Tris-HCl, KCl, 0,2% Triton X-100, MgCl<sub>2</sub>, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Taq DNA polymeráza, monoklonální protilátka anti-Taq Green I, stabilizátory a aditiva

### **4.7 KULTIVACE**

Před zahájením kultivace se agarové plotny nechaly temperovat, aby dosáhly laboratorní teploty. Vzorky byly poté nanášeny z transportní zkumavky s Amiesovou půdou přímo na agar a rozočkovány sterilní kličkou. Kultivace probíhala 2-5 dní při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Tyčinka z transportní zkumavky se nevyhazovala, ale zalomila do Mueller-Hintonova bujónu. Kultivace probíhala 24 hodin také při 37 °C a v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Vzorky v bujónu byly dále použity pouze pro izolaci nukleové kyseliny.

### **4.8 MIKROSKOPIE**

Ze suspektní kolonie bylo odebráno malé množství biomasy, která se sterilní kličkou suspendovala v kapce fyziologického roztoku. Zaschlý nátěr se fixoval nad plamenem.

Barvení preparátu dle Grama probíhalo následovně: Preparát se pokryl krystalovou violetí a po 20 sekundách se spláchl Lugolovým roztokem. Lugolův roztok se ponechal 20 sekund působit a poté několik sekund oplachoval acetonem a vodou. Nakonec se preparát dobarvil karbolfuchsinem a po jedné minutě opláchnul a usušil. Vzniklý obarvený vzorek byl pozorován po mikroskopem s imerzním olejem při celkovém zvětšení 1000x.

### **4.9 PRŮKAZ METODOU PCR**

Pro stanovení přítomnosti *Capnocytophaga canimorsus* v testovaných vzorcích byl jako vzor použit postup dle literatury (Suzuki et al.; 2010) (6). Pro potřeby zavedení metody byl použit srovnávací kmen bakterie *Capnocytophaga canimorsus* CCM 3709 z České sbírky mikroorganismů.

Izolace nukleové kyseliny probíhala dvěma způsoby: Vzorek byl z transportní půdy buď ihned zalomen do Mueller-Hintonova bujónu a kultivován 1 den při 37 °C v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub> nebo byly suspektní kolonie vykultivované na krevním agaru přeneseny do 100 µl PCR vody. Následovávala lýza buněk v suchém teple 10 minut při 95 °C.

Přítomnost bakterie byla stanovena za použití stejných oligonukleotidových primerů, které použil ve své publikaci Suzuki (2010).

Sekvence forward primeru byla 5'-GTAGAGTGCTTCGGCACTTG-3' a reverse primeru 5'-GCCGATGCTTATTCATACA-3' (6). Příprava master mixu byla provedena dle pokynů výrobce (Top-Bio, Česká republika) a obsahovala 3 µl vyizolované DNA, 12,5 µl PPP Master mix (Top-Bio, Česká republika) pro klasickou PCR s detekcí na gelu, 0,5 µl 0,1 mM CaL2 primeru, 0,5 µl 0,1 mM CaR primeru. Nakonec se reakční směs doplnila vodou na objem 25 µl.

Amplifikace pro PCR s detekcí na agarórovém gelu probíhala v přístroji Thermocycler TProfessional (Biometra, Německo). Teplotní program byl zvolen stejný jako uvedl ve svém článku Suzuki.

Denaturace	95 °C	5 min
35x	95 °C	30 s
	58 °C	1 min
	72 °C	1 min
1x	72 °C	7 min

Takto připravená amplifikovaná nukleová kyselina byla ihned použita k detekci na agarózovém gelu.

#### 4.9.1 PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU

1,2 g agarózy bylo v mikrovlnné troubě rozpuštěno v 80 ml 1x TBE pufru, tak aby vznikl homogenní roztok. Ten se zchladil na teplotu zhruba 60 °C (příliš horký roztok může rozkládat detekční barviva a studený může začít tuhnout a při nalévání nebude mít homogenní strukturu). Po vychladnutí byly přidány 4 µl ethidium bromidu jako detekčního barviva a vzniklá směs byla opatrně přelita do tvořítka s vloženým hřebínkem, který po ztuhnutí vytvoří jamky, do kterých se přidávají vzorky. Gel se nechal půl hodiny ztuhnout, odstranil se hřebínek a přemístil se do elektroforetické vany.

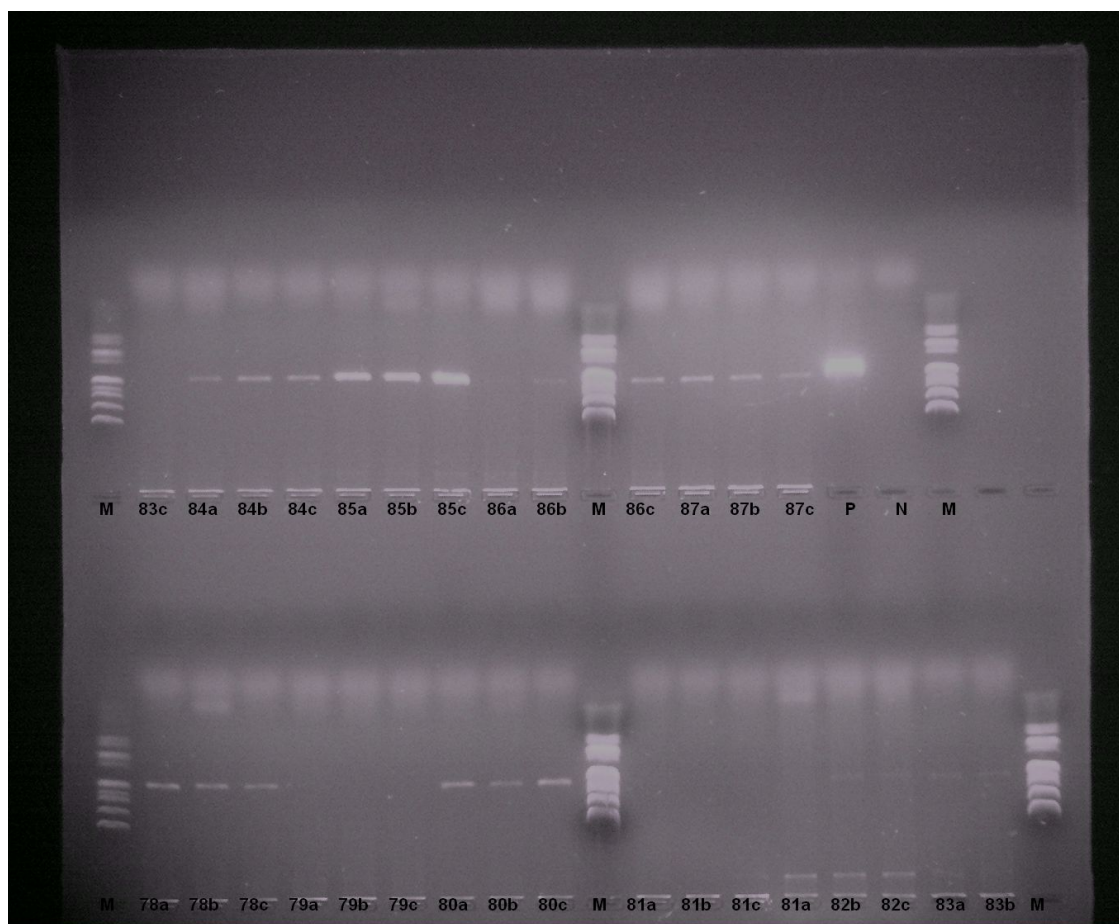
Do jednotlivých jamek se pipetovalo vždy 10 µl amplifikované nukleové kyseliny, negativní kontroly nebo pozitivní kontroly. Do první jamky se přidalo 5 µl DNA Markeru. Nebylo potřeba použít vkládací pufr, jelikož již byl součástí použitého master mixu.

#### 4.9.2 DETEKCE NA GELU

Elektroforetická vana s napipetovanými vzorky byla vložena do elektroforetického zdroje. Přístroj byl zapnut na 50 minut při napětí 300 mA a proudu 100 V. Nukleové kyseliny nesou přirozeně záporný náboj a v elektrickém poli se tak pohybují směrem je kladně nabitě



elektrodě. Po dokončení separace byl gel vložen do UV transluminátoru a pomocí digitální kamery a počítačového softwaru byly vyhodnoceny výsledky (Obr.10).



**Obrázek 10** Detekce *C. canimorsus* na agarózovém gelu. M = DNA marker, P = pozitivní kontrola, N = negativní kontrola (Obrázek z archivu autora)

#### **4.10 IZOLACE DNA ZE VZORKŮ (PRO POUŽITÍ V REAL-TIME PCR)**

K izolaci nukleové kyseliny pro identifikaci metodou qPCR byl použit komerčně dodávaný kit QIAamp DNA mini Kit od firmy QIAGEN (Německo). Izolace probíhala v laboratoři k tomu určené a veškeré manipulace se vzorkem v laminárním boxu (67).

Sady QIAamp DNA Mini poskytují rychlé a snadné metody pro purifikaci celkové DNA pro spolehlivou PCR metodu. Celková DNA (např. genomová, virová, mitochondriální) může být purifikována z plné krve, plazmy, séra, kostní dřeně, jiných tělesných tekutin a podobně. Tento jednoduchý postup izolace (Obr. 11) poskytuje čistou DNA připravenou k přímé amplifikaci již za 20 minut. DNA je eluována v pufru AE (součástí kitu) a je připravena

k přidání do PCR nebo do jiných enzymatických reakcí. Purifikovaná DNA neobsahuje protein, nukleázy a ani další kontaminanty nebo inhibitory (67).

Použité reagensie, které jsou součástí kitu:

Lyzační pufr AL  
Promývací pufr AW1  
Promývací pufr AW2  
Eluční pufr AE  
Proteináza K

Lyzační pufr je upraven tak, aby umožnil optimální navázání DNA na membránu. DNA je adsorbována na křemičitou membránu během krátké centrifugace. Díky přesně danému pH tohoto pufru je zajištěno, že proteiny a další kontaminanty, které mohou inhibovat PCR reakci, nejsou zadržovány na membráně (67).

Zbytky nečistot jsou promyty ve dvou stupních centrifugace. Používají se dva různé pufrы AW1 a AW2, které výrazně zlepšují čistotu eluované DNA. Purifikovaná DNA se poté eluuje z kolony v koncentrované formě v elučním pufru AE. Tento pufr je před použitím ekvilibrován na pokojovou teplotu (15-25 °C). Eluovaná DNA může mít délku až 50 kb a je vhodná pro přímé použití v PCR aplikacích (67).

Postup:

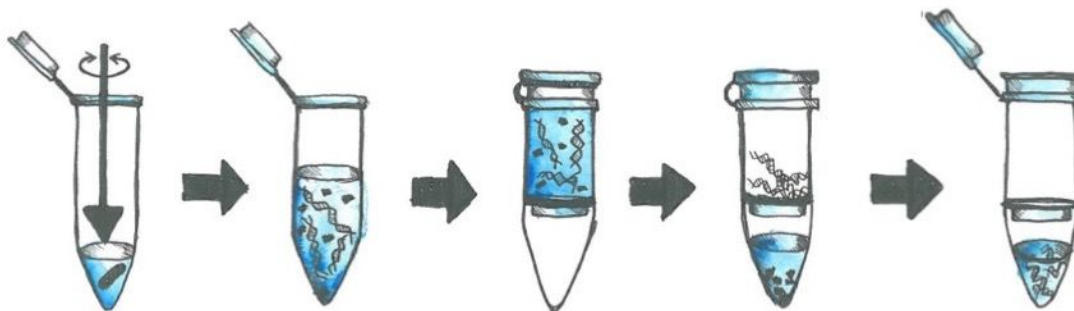
Postup purifikace DNA zahrnuje čtyři kroky a provádí se pomocí kolon QIAamp Mini spin ve standardní mikrocentrifuze. Postupy jsou navrženy tak, aby nedocházelo ke křížové kontaminaci mezi vzorky a umožňují bezpečnou manipulaci s potenciálně infekčními vzorky.

Nejprve bylo 500 µl vzorku přeneseno do čisté mikrozkušavky, k tomu bylo přidáno 20 µl proteinázy K (součástí kitu) a 500 µl pufru AL, vše se zvortexovalo a inkubovalo 10 minut při 56 °C. Poté se přidalo 500 µl etanolu a promíchalo převrácením zkumavky. V následujících krocích (1.-5.) se používaly sběrné zkumavky, vždy nová po každé centrifugaci.

1. 2x se přeneslo 740 µl na kolonu a centrifugovalo 30 s při 12 500 rpm.
2. Přidalo se 600 µl pufru AW1 na kolonu a centrifugovalo 15 s při 12 500 rpm.
3. Přidalo se 600 µl pufru AW2 na kolonu a centrifugovalo 15 s při 12 500 rpm.
4. Následoval stejný krok jako předtím, a tedy se opět přidalo 600 µl pufru AW2 a centrifugovalo za stejných podmínek.
5. Centrifugovalo se 2 minuty při 12 500 rpm, aby se vysušila membrána.

Kolona se přesunula do čisté Eppendorf mikrozkušavky (1,5 µl) a přidalo se 50 µl elučního pufru AE. Kolona se nechala 1 minutu stát a poté centrifugovala 45 s při 12 500 rpm.

Izolovaná DNA se skladovala při -20 °C (67).



Obrázek 11 Princip izolace nukleové kyseliny na kolonkách (68)

#### 4.11 STANOVENÍ *CAPNOCYTOPHAGA CANIMORSUS* POMOCÍ REAL-TIME PCR

Pro real-time PCR byly použity stejné primery, jako pro PCR s detekcí na agarózovém gelu. Sekvence forward primeru byla tedy 5'-GTAGAGTGCTTCGGCACTTG-3' a reverse primeru 5'-GCCGATGCTTATTCATACA-3'.

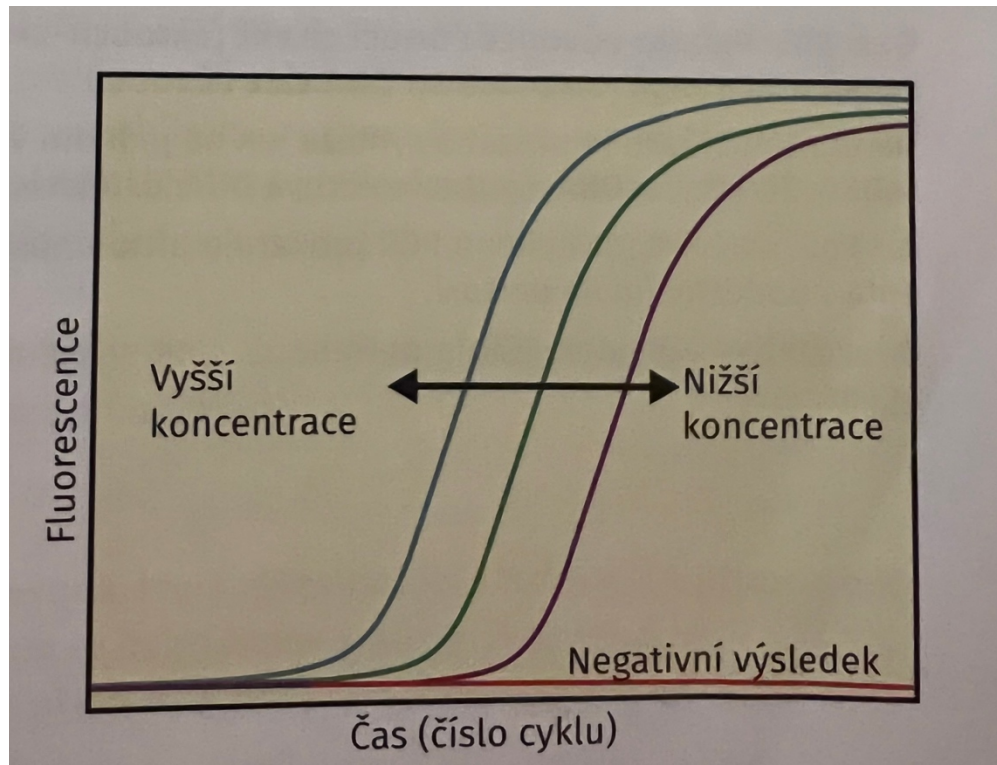
Master mix byl také připravován obdobně jako při zavádění PCR na gelu a obsahoval 12,5 µl qPCR 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, Česká republika), 0,5 µl 0,1 mM CaL2 primeru, 0,5 µl 0,1 mM CaR primeru. Směs byla zvortexována a do jednotlivých jamek v destičce bylo pipetováno 22 µl master mixu a 3 µl vyizolované DNA. Destička byla uzavřena ochrannou fólií a vložena do thermocycleru CFX96 (BioRad, USA).

Teplotní program byl optimalizován a nastaven následovně:

Úvodní denaturace	94 °C	5 min
Vlastní amplifikace a detekce fragmentu – opakuje se 45 x		
Denaturace	94 °C	10 s
Nasednutí primerů	58 °C	10 s
Extenze	72 °C	20 s
High resolution melting analýza	50 °C	30 s

Teplota tání: 50–70 °C

Vzhledem k tomu, že se jedná o metodu PCR v reálném čase je možné pozitivitu vzorků vyhodnotit rovnou z grafu v počítači, který je napojen přímo na CFX. U pozitivních vzorků je patrná exponenciální křivka (Obr. 12) do 35. cyklu. Později mohou vznikat nespecifické produkty.



Obrázek 12 Vyhodnocení pozitivního vzorku (4)

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 PRŮKAZ METODOU PCR

Postup pro PCR s detekcí na gelu byl použit stejný, jako uvedl ve svém článku z roku 2010 Suzuki. Ten ve své práci porovnával několik různých primerů a jako nejvhodnější se ukázala právě dvojice CaL2 a CaR. Jeho studie z Japonska měla velmi dobré výsledky, a tak byly pro zavedení PCR použity stejné primery, stejný teplotní program i metoda izolace nukleové kyseliny. Celý postup byl nejprve ověřen na sbírkové kultuře *Capnocytophaga canimorsus*.

### 5.2 REAL-TIME PCR

Jako vzorky byly použity stěry z dutiny ústní psů a koček. Stěry byly prováděny na veterinární klinice pod dohledem odborníka a ihned po provedení odběru, byla stěrová tyčinka buď zalomena do tekutého transportního média Liquid Amies od firmy COPAN, nebo vložena do amiesovy půdy s aktivním uhlím. Vzorky byly poté transportovány do laboratoře a uchovány při teplotě 5 °C po dobu maximálně pěti dnů. Poté byly ihned zpracovávány.

#### 5.2.1 OPTIMALIZACE METODY

Vzhledem k tomu, že se citované články věnovaly pouze PCR s detekcí na gelu, bylo nutné vzorky nejprve otestovat touto zavedenou metodou. Real-time PCR metoda je oproti klasické PCR s detekcí na gelu citlivější, poskytuje možnost kvantifikace a je také časově méně náročná, proto bylo na místě pokusit se optimalizovat především tuto metodu. Nejprve byla testována stejná sbírková kultura bakterie *Capnocytophaga canimorsus*, jako při klasické PCR a po náležité optimalizaci se mohlo pokračovat v porovnání metod na reálných vzorcích.

Jako největší problém se ukázala volba vhodného postupu izolace DNA, která musela u každé metody probíhat trochu jiným způsobem a to tak, že u qPCR musel být k izolaci použit komerčně dodávaný kit od firmy QIAGEN a u PCR s detekcí na agarózovém gelu stačila k detekci pouze lýza buněk suchým teplem.

Běžnou lýzou bakteriálních buněk suchým teplem nebyly některé pozitivní vzorky pomocí qPCR odhaleny vůbec anebo nebyla výsledná křivka exponenciální, tak jak by v případě positivity měla být. Kultivované vzorky v Mueller-Hintonově bujónu neměly zdaleka takové křivky, jako když byly stejné vzorky přečištěny na kolonkách. Mikrofóra v ústní dutině psů a koček je velmi rozmanitá a samotná lýza buněk teplem nemusí být dostatečná.

U PCR s detekcí na agarózovém gelu byl k přípravě master mixu použit PPP Master Mix od firmy Top-Bio (Česká republika). Jeho výhody spočívaly především v tom, že nemusel být použit žádný vkladací pufr, protože tento mix již obsahoval barvivo a také ověřený a vyvážený poměr dNTP a Mg<sup>2+</sup> iontů.

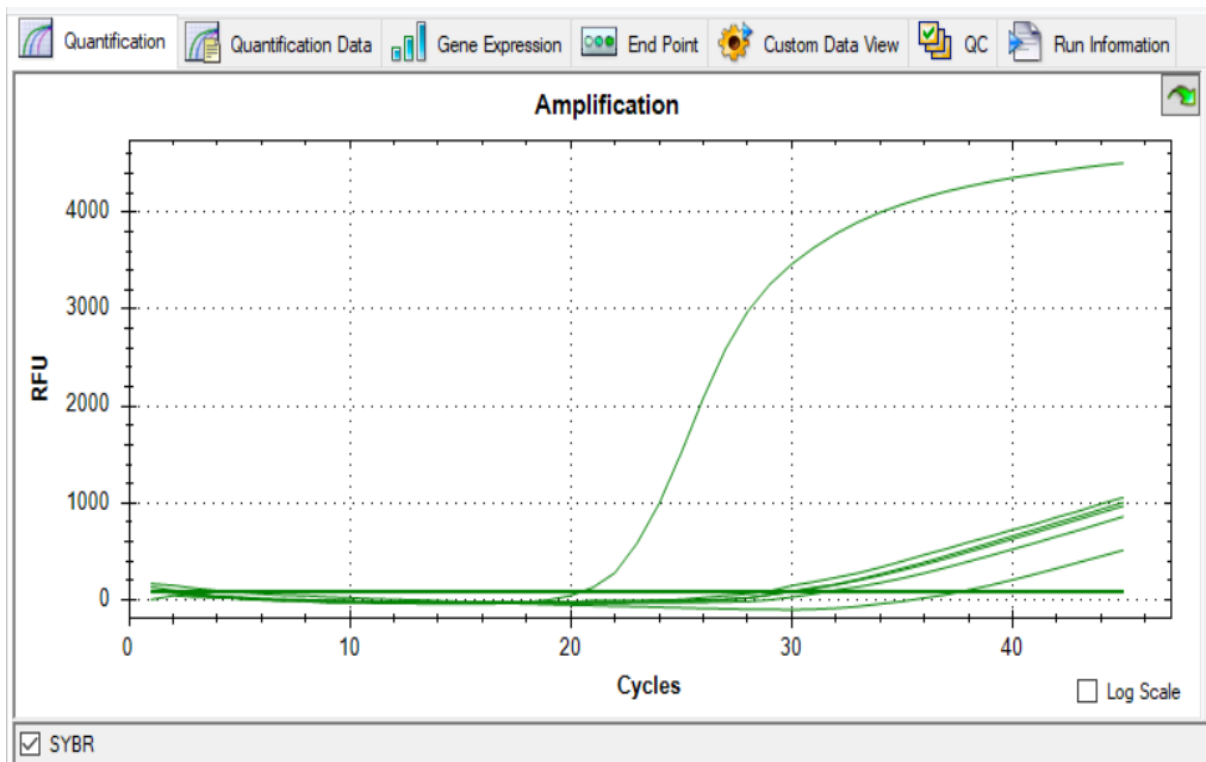
Vzhledem k dobré zkušenosti s master mixem, byl pro qPCR použit master mix od stejné firmy. Master Mix qPCR 2x SYBR Master Mix obsahuje fluorescenční barvivo SYBR Green I, které se po navázání na dvouvláknovou DNA stává silně fluorescenční. Produkt obsahoval všechny potřebné komponenty, takže to značně urychlilo přípravu reakční směsi a stačilo jen dodat primery a doplnit ultračistou vodou, která byla součástí balení. Primery byly použity stejné jako u PCR s detekcí na gelu – tedy CaL2 a CaR.

Teplotní program musel být oproti původně zavedené metodě několikrát upravován a optimalizován. Jako první byl otestován stejný teplotní program, který byl použit při zavádění PCR a měl ho ve své publikaci uvedený také Suzuki (2010). Ten na qPCR neodhalil žádný pozitivní vzorek a nemohl tak být použit. Firma Top-Bio k návodu na použití master mixu dodala obecný návod na sestavení teplotního programu s použitím jejich master mixu. Dle tohoto postupu byly sice odhaleny některé pozitivní vzorky, ale křivky stále nebyly ideální a také docházelo k velké odezvě pozadí.

Nakonec se povedlo vytvořit vhodný teplotní program, který byl pro testování *Capnocytophaga canimorsus* optimální a poskytoval velmi podobné výsledky jako při testování stejných vzorků detekovaných na gelu. Zároveň tato optimalizace přinesla značnou časovou úsporu, kdy samotná PCR pro detekci na gelu (prováděná dle článku) trvá přibližně 2 hodiny a optimalizovaná metoda pro qPCR pouze hodinu a patnáct minut.

#### 5.2.1.1 OVĚŘENÍ SPECIFITY

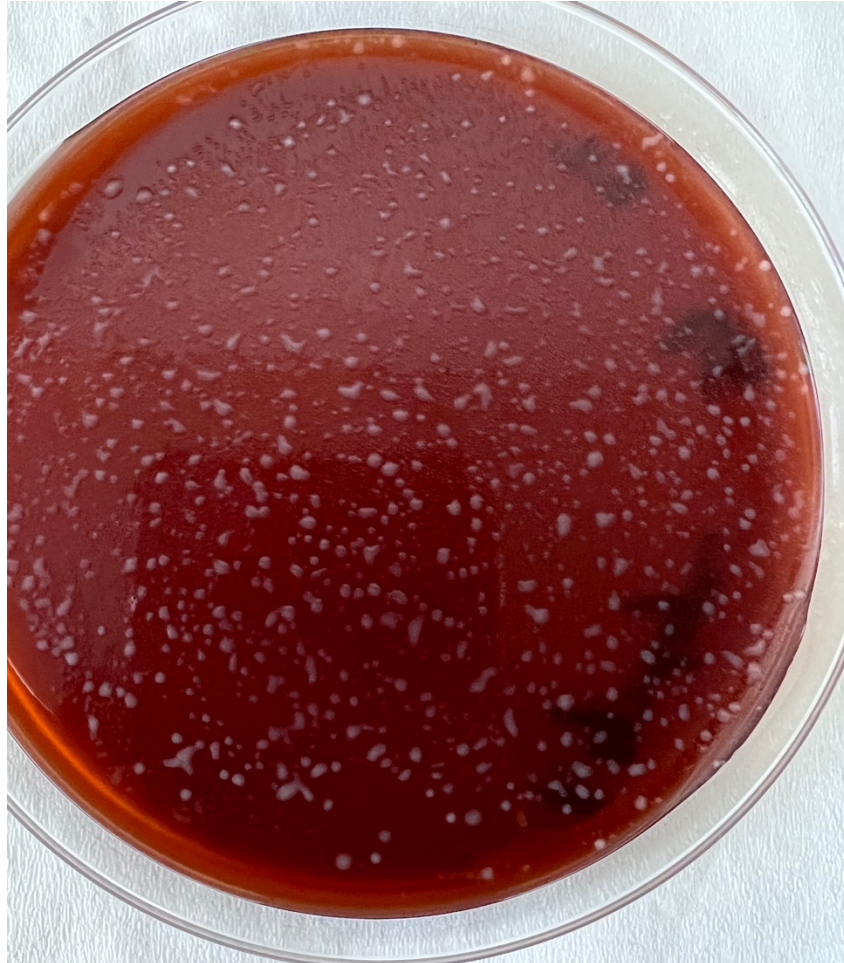
Ověření specifity bylo provedeno za účelem zjištění, zda zvolené primery umožňují amplifikaci a detekci pouze bakterie *Capnocytophaga canimorsus*. K ověření specifity primerů CaL2, CaR a komerčně dodávaného SYBR green mixu bylo použito 5 různých, běžně se vyskytujících mikroorganismů. Konkrétně byly použity referenční kmeny *Staphylococcus aureus* CCM 3823, *Haemophilus influenzae* CCM456, *Streptococcus pneumoniae* CCM4424, *Candida albicans* CCM 8186 a *Aspergillus fumigatus* CCM F-373.



**Graf 1** Ověření specifity reakce. Osa X = počet cyklů, Osa Y = fluorescence. *Capnocytophaga canimorsus* je zde pozitivní na 21. cyklu. *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans* a *Asperigillus fumigatus* jsou negativní.

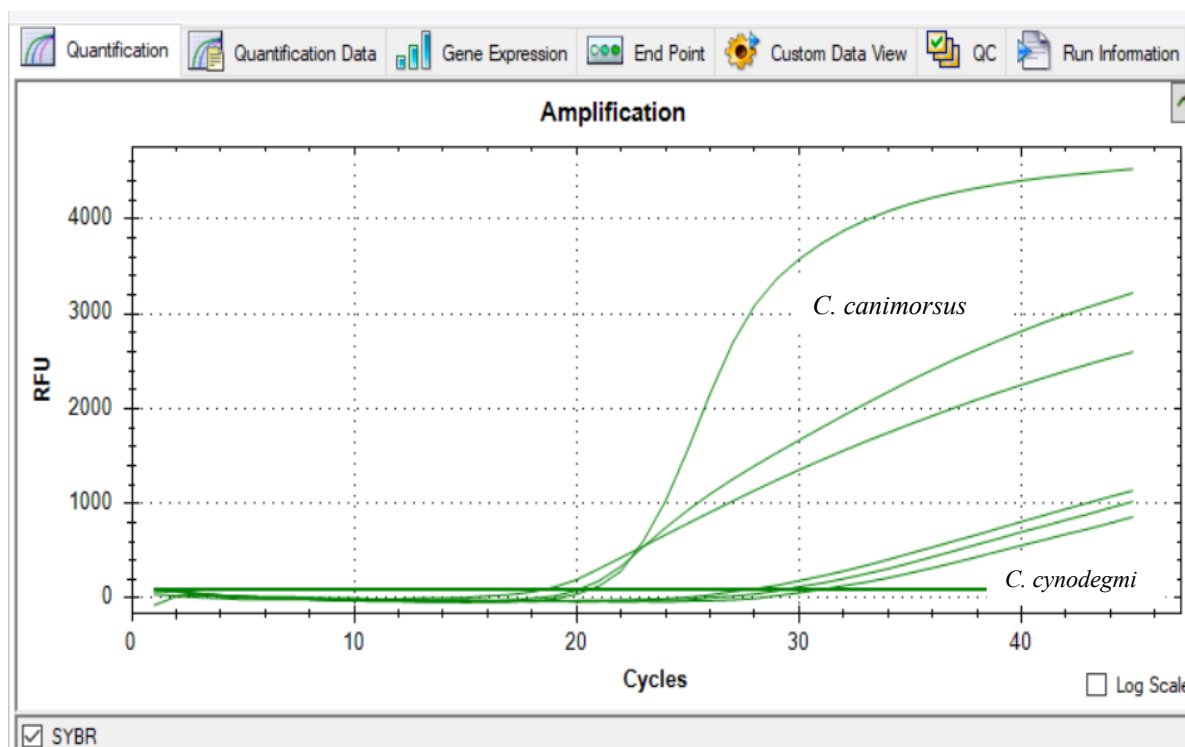
Izolace DNA, amplifikace a detekce byla u těchto referenčních vzorků provedena stejným způsobem jako u všech vzorků testovaných metodou qPCR. Na základě parametrů Ct bylo ověřováno, zda primery CaL2 a CaR amplifikují pouze bakterii *Capnocytophaga canimorsus*. Ta byla v testu zároveň použita jako pozitivní kontrola.

Z německé sbírky mikroorganismů byla získána čistá kultura bakterie *Capnocytophaga cynodegmi* DSM 19736 (Obr. 13), která je bakterii *C. canimorsus* fenotypově nejvíce podobná. Ověření selektivity bylo potvrzeno i u této bakterie (Graf 2), tedy její DNA nebyla amplifikována.



**Obrázek 13** Růst *Capnocytophaga cynodegmi* na krevním agaru (Obrázek z archivu autora)





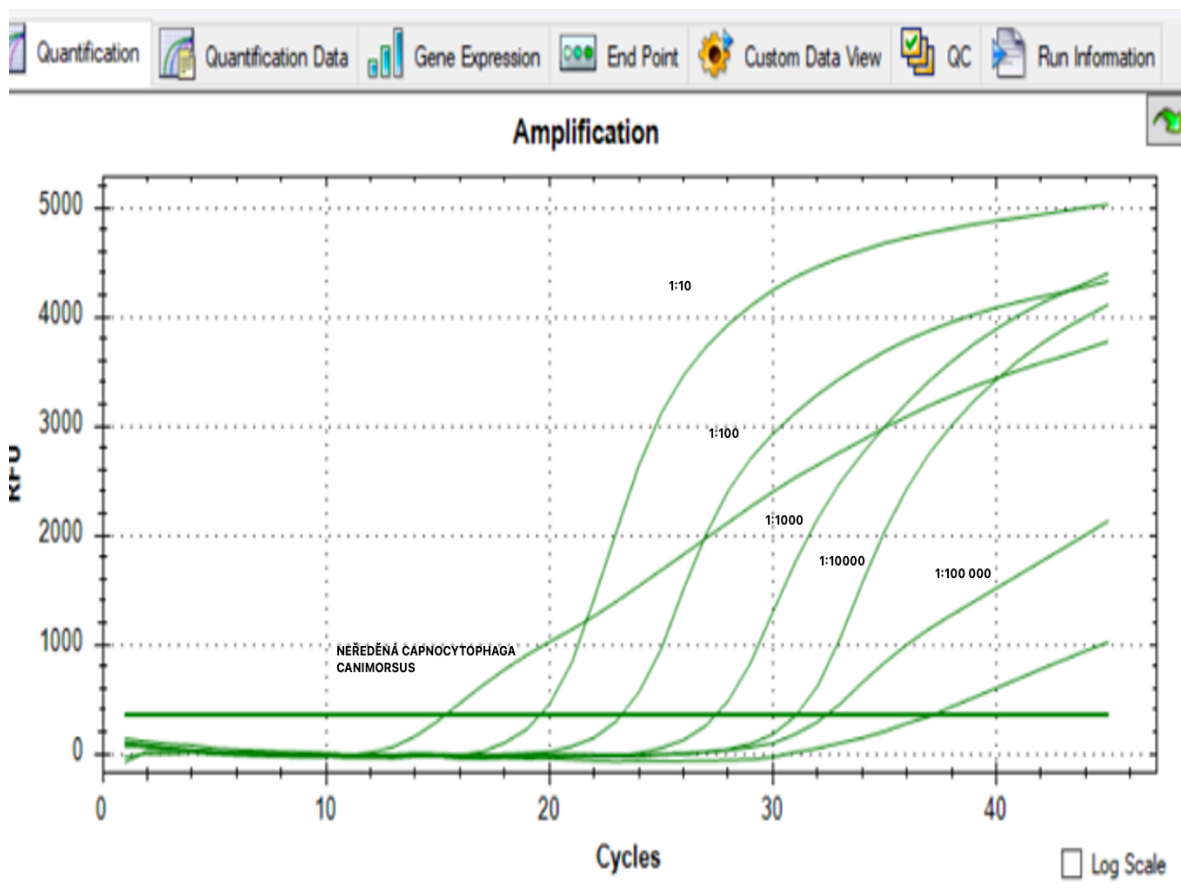
**Graf 2** Ověření, zda primery nereagují s *C. cynodegmi*. Vzorky obou bakterií byly stanoveny v tripletech. První tři vzorky v grafu, které jsou pozitivní již na 21. cyklu odpovídají bakterii *C. canimorsus*.

Z výsledků, které jsou z obou grafů patrné, vyplývá, že zvolené primery jsou opravdu specifické pouze pro *Capnocytophaga canimorsus* (pozitivita na 21. cyklu). U zbylých bakterií vznikají ke konci měření nespecifické produkty, které nelze považovat za pozitivní odezvu.

### 5.2.1.2 STANOVENÍ SENZITIVITY

Stanovení senzitivity reakce se provádí stanovením detekčního limitu. Za pomoci spektrofotometru byla stanovena absorbance izolované DNA na přístroji PDA UV-VIS Spektrometru (RMI, s.r.o.). Metoda využívá toho, že DNA je schopna absorbovat ve vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Z naměřených hodnot byla vypočtena koncentrace vyizolované DNA. Koncentrace DNA v referenčním vzorku, který se dále ředil a ve všech měřeních také používal jako pozitivní kontrola, byla 129,52 ng/μl.

Desetinásobným ředěním byl pak stanovován detekční limit reakce. Jak je patrné z grafu, tak nejnižší ještě detekovatelný pozitivní signál byl při ředění 100 000x. To znamená při koncentraci DNA 1,295 pg/μl. Při ředění 1 000 000x vznikaly nespecifické produkty, stejně jako u negativní kontroly a tato odezva se nedá považovat za pozitivní detekci.



**Graf 3** Stanovení senzitivity reakce pomocí desítkového ředění. Osa X zobrazuje počet cyklů a osa Y fluorescenci.

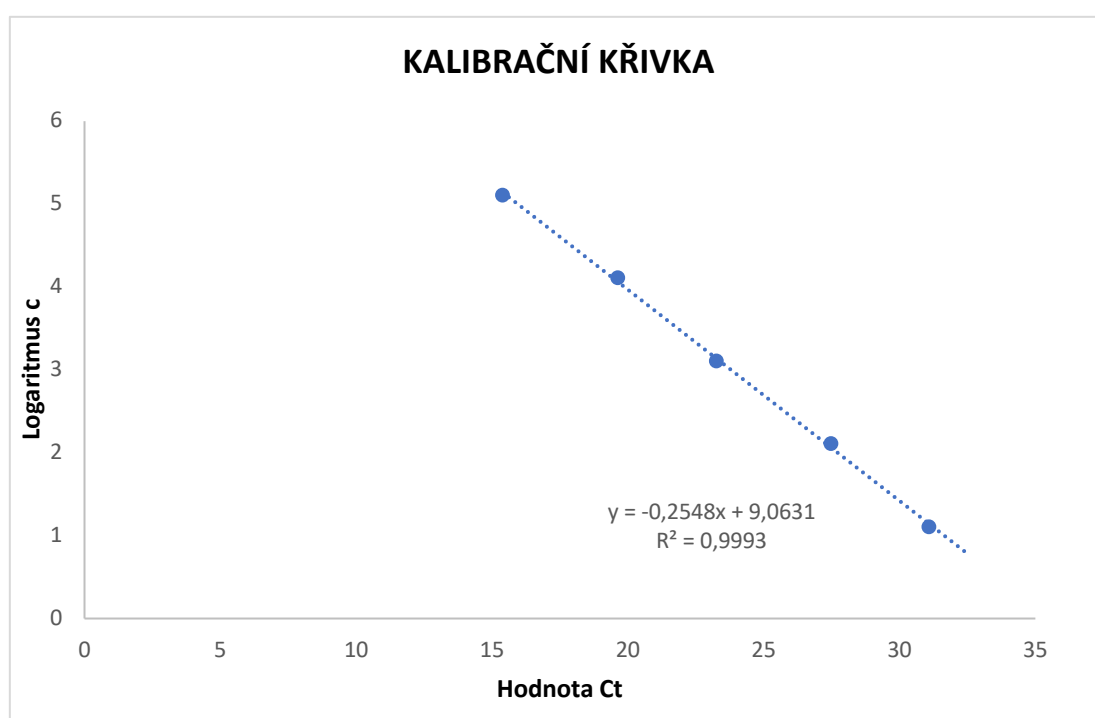
Na základě znalosti nejnižšího detekovatelného pozitivního signálu a koncentrace nukleové kyseliny, byla sestavena kalibrační křivka.

### 5.2.1.3 KVANTIFIKACE

K sestavení kalibrační křivky a provedení kvantifikace byla použita standardní ředící řada z předchozí kapitoly o známé koncentraci. Poté byl sestaven graf závislosti hodnot Ct na logaritmu počtu kopií. Mezi logaritmem počtu výchozích kopií a hodnotou Ct je lineární vztah. Výchozí množství kopií DNA v neznámém vzorku lze poté vypočítat z rovnice lineární regrese kalibrační křivky. K potřebám této práce, stejně jako pro většinu aplikací qPCR není potřeba znát přesnou koncentraci nukleové kyseliny. Obecně totiž platí, že čím větší je množství templátové DNA vstupující do reakce, tím je hodnota Ct nižší (39).

**Tabulka 2** Stanovení kalibrační řady

Ředění	c DNA (pg/μl)	log c	Ct
<i>C.canimorsus</i>	129520	5,112	15,39
10x	12952	4,112	19,61
100x	1295,2	3,112	23,24
1 000x	129,52	2,112	27,47
10 000x	12,952	1,112	31,07
100 000X	1,2952	0,112	32,45
1000 000x	0,12952	–	37,28
NK	0	–	39,12

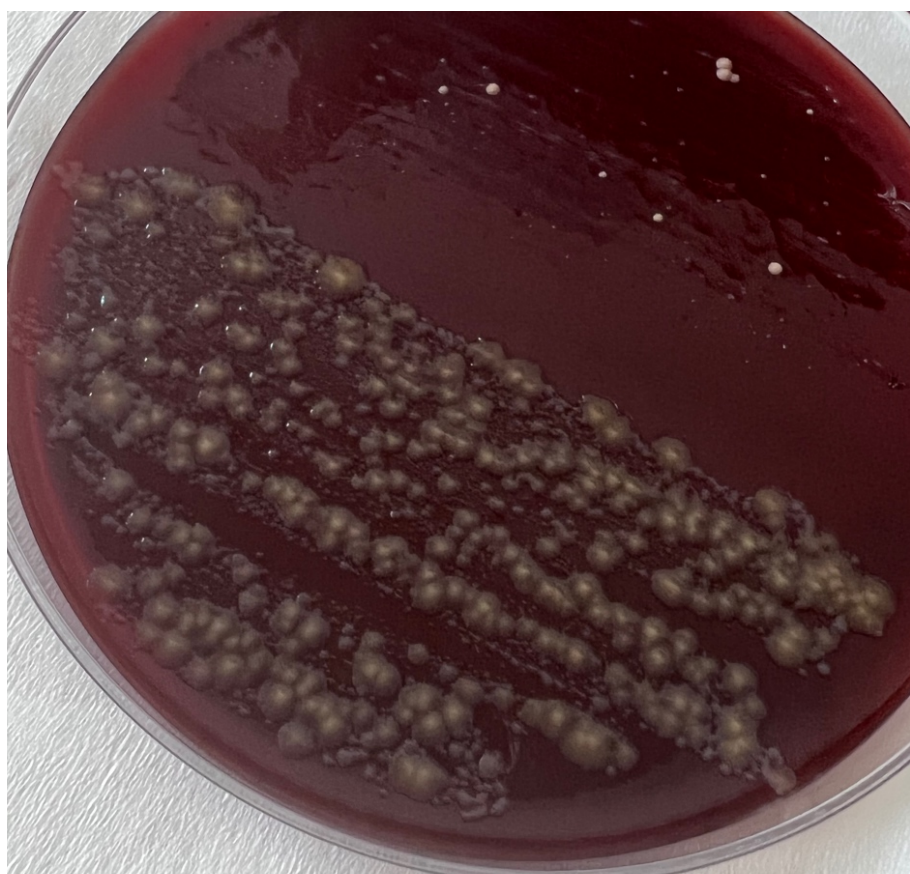


**Graf 4** Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace DNA v neznámém vzorku

Z grafu kalibrační křivky je patrné, že ředění vzorku bylo téměř přesné a hodnoty začínají kolísat až při koncentraci, která v tomto případě odpovídá limitu detekce. Jako limit detekce byla stanovena koncentrace 1,2952 pg/μl a této hodnoty bylo dosaženo při ředění 100 000x. Při vyšším ředění mělo Ct hodnotu 37,28 a to už neodpovídá pozitivní odezvě. V celé práci se jako pozitivní považovaly vzorky do 35 cyklu.

### 5.3 POROVNÁNÍ PCR METOD

Výsledky klasické PCR a qPCR se téměř shodovaly. 91,7 % testovaných vzorků vyšlo totožně oběma metodami. Odlišný výsledek byl pouze u dvou vzorků koček (8,3 %), kdy pomocí real-time PCR vyšly oba pozitivně a PCR s detekcí na agarózovém gelu pozitivita odhalena nebyla. Pravděpodobně se izolací na kolonkách zvýšila citlivost metody, čemuž nasvědčuje i fakt, že pomocí spektrofotometrie bylo zjištěno, že DNA izolovaná kitem QIAamp má velmi vysokou čistotu, tudíž tam neinterferují látky, které by mohly snižovat citlivost reakce. Jinými testy tyto dva vzorky bohužel ověřeny být nemohly. Kultivace u nich nebyla průkazná ani po pěti dnech a krevní agar nakonec začal přerůstat ostatní mikroflórou (Obr. 14) - suspektní kolonie tak nemohly být patrné. Jako nejvhodnější způsob pro ověření těchto podezřelých vzorků by mohla být sekvenace pomocí 16S rRNA, což je ribosomální RNA, jejíž sekvence je dlouhá 1500 bp a gen kódující tento úsek je přítomen u všech bakterií. Při identifikaci konkrétní bakterie se využívá toho, že díky evoluci dochází ke změnám tohoto genu a každý bakteriální druh má svou charakteristickou sekvenci (39). Tato metoda je ale bohužel nad finanční a časové možnosti této diplomové práce.



**Obrázek 14** Krevní agar přerostlý mikroflórou z dutiny ústní kočky (Obrázek z archivu autora)

**Tabulka 3** Porovnání vzorků psů

Vzorek	Pohlaví	PCR s detekcí na gelu	qPCR
P001	pes	+	+
P002	pes	+	+
P003	pes	-	-
P004	pes	-	-
P005	fena	+	+
P006	fena	-	-
P007	pes	+	+
P008	pes	+	+
P009	fena	-	-
P010	fena	+	+
P011	fena	+	+
P012	fena	+	+
P013	fena	+	+
P014	fena	+	+
P015	pes	+	+
P016	pes	+	+

**Tabulka 4** Porovnání vzorků koček. Vzorky, které jsou v tabulce označeny žlutě mají rozdílný výsledek

Vzorek	Pohlaví	PCR s detekcí na gelu	qPCR
K001	kocour	-	-
K002	kočka	-	-
K003	kočka	-	-
K004	kocour	-	-
K005	kočka	-	-
K006	kocour	+	+
K007	kocour	-	+
K008	kočka	-	+

### 5.3.1.1 TESTOVÁNÍ REÁLNÝCH VZORKŮ

Testy senzitivity a specifity ověřily, že byly vhodně zvoleny použité primery a SYBR Green Master Mix. Izolací DNA na kolonkách pomocí komerčně dostupných kitů se povedlo citlivost reakce ještě zvýšit.

Real-time PCR metodou bylo otestováno dalších 60 vzorků. Se vzorky, které byly použity k porovnání metod je to tedy celkem 84 různých vzorků psů a koček.

Z 84 testovaných vzorků bylo 50 vzorků psích (32 psů a 18 fen) a 34 vzorků pocházelo od koček (20 kocourů a 14 koček). Celkově bylo metodou real-time PCR odhaleno 54 (64,29 %) pozitivních vzorků na bakterii *Capnocytophaga canimorsus*. Z toho bylo 34 pozitivních vzorků psů (68 %) a 20 vzorků koček (58,8 %), což je velmi podobné číslo, jako v jiných světových člancích, které se prevalenci *C. canimorsus* věnují.

Tabulka 5 Výsledky testovaných psů

Vzorek	Pohlaví	Datum odběru	qPCR	Ct
P001	pes	10.2.2022	+	22,3
P002	pes	10.2.2022	+	24,28
P003	pes	10.2.2022	-	-
P004	pes	10.2.2022	-	-
P005	fena	10.2.2022	+	26,54
P006	fena	10.2.2022	-	-
P007	pes	10.2.2022	+	30,29
P008	pes	10.2.2022	+	18,92
P009	fena	10.2.2022	-	-
P010	fena	10.2.2022	+	16,45
P011	fena	16.2.2022	+	31,3
P012	fena	16.2.2022	+	25,48
P013	fena	16.2.2022	+	27,76
P014	fena	16.2.2022	+	27,47
P015	pes	16.2.2022	+	31,07
P016	pes	16.2.2022	+	22,33
P017	pes	22.2.2022	-	-
P018	pes	22.2.2022	-	-
P019	pes	22.2.2022	+	34,59
P020	fena	22.2.2022	+	29,09
P021	pes	22.2.2022	+	15,4
P022	pes	22.2.2022	-	-
P023	fena	22.2.2022	+	25,92
P024	pes	22.2.2022	+	20,14
P025	pes	22.2.2022	-	-
P026	pes	22.2.2022	+	28,72
P027	fena	22.2.2022	+	35,02
P028	pes	22.2.2022	-	-
P029	fena	22.2.2022	+	31,04
P030	pes	18.3.2022	+	25,44
P031	fena	18.3.2022	-	-
P032	pes	18.3.2022	+	32,14
P033	pes	18.3.2022	-	-
P034	fena	18.3.2022	+	25,42
P035	pes	18.3.2022	+	17,36
P036	fena	18.3.2022	+	21,38
P037	pes	18.3.2022	+	34,97
P038	pes	18.3.2022	+	28,76
P039	fena	18.3.2022	-	-
P040	fena	18.3.2022	+	33,02

Vzorek	Pohlaví	Datum odběru	qPCR	Ct
P041	pes	18.3.2022	–	–
P042	pes	18.3.2022	+	20,15
P043	fena	18.3.2022	+	26,75
P044	pes	18.3.2022	–	–
P045	pes	5.4.2022	–	–
P046	pes	5.4.2022	+	34,22
P047	pes	5.4.2022	+	14,67
P048	pes	5.4.2022	–	–
P049	pes	5.4.2022	+	18,25
P050	pes	5.4.2022	+	23,04



Tabulka 6 Výsledky testovaných koček

Vzorek	Pohlaví	Datum odběru	qPCR	Ct
K001	kocour	10.2.2022	–	–
K002	kočka	10.2.2022	–	–
K003	kočka	10.2.2022	–	–
K004	kocour	10.2.2022	–	–
K005	kočka	16.2.2022	–	–
K006	kocour	16.2.2022	+	19,23
K007	kocour	16.2.2022	+	22,39
K008	kočka	16.2.2022	+	20,87
K009	kocour	22.2.2022	+	27,49
K010	kocour	22.2.2022	–	–
K011	kocour	22.2.2022	–	–
K012	kočka	22.2.2022	+	29,18
K013	kocour	22.2.2022	+	25,74
K014	kocour	18.3.2022	+	32,05
K015	kočka	18.3.2022	–	–
K016	kočka	18.3.2022	+	17,29
K017	kocour	18.3.2022	+	17,98
K018	kocour	18.3.2022	–	–
K019	kocour	18.3.2022	–	–
K020	kocour	18.3.2022	+	33,45
K021	kočka	18.3.2022	+	26,02
K022	kocour	18.3.2022	+	23,77
K023	kočka	18.3.2022	+	24,4
K024	kocour	18.3.2022	–	–
K025	kocour	5.4.2022	–	–
K026	kocour	5.4.2022	+	30,1
K027	kocour	5.4.2022	+	27,21
K028	kočka	5.4.2022	+	16,41
K029	kočka	5.4.2022	–	–
K030	kočka	5.4.2022	+	23, 94
K031	kočka	5.4.2022	+	35,22
K032	kocour	5.4.2022	+	21,18
K033	kocour	5.4.2022	–	–
K034	kočka	5.4.2022	+	15,92

Hlavním cílem této práce bylo optimalizovat qPCR metodu, a to především z důvodů vyšší senzitivity metody a časové úspory. Z časového hlediska se povedlo celou identifikaci zkrátit na celkový čas dvě hodiny, a to včetně izolace nukleové kyseliny. Je zřejmé, že čím více vzorků se najednou izoluje, tím práce trvá déle. Ruční izolaci DNA v klinických laboratořích pomalu nahrazují automatické přístroje, při vyšším počtu vzorků přinesou značnou časovou úsporu. V tomto případě, kdy bylo izolovaných maximálně 10 vzorků najednou by automatická izolace nepřinesla výrazné urychlení a jen by se použitím dalšího přístroje zvyšovala cena za reakci.

Po správné optimalizaci metody bylo dalším cílem otestovat reálné vzorky, nastínit výskyt *C. canimorsus* v České republice a porovnat tyto výsledky se zahraničními statistikami. Podobné studie byly prováděny například ve Švýcarsku, Belgii, Nizozemsku, Japonsku a Íránu. Íránská studie z roku 2019 (69) používala podobný postup jako Suzuki v roce 2010 a to včetně zvolených primerů a detekce na gelu. Celkem ze 160 vzorků měly pozitivních 50 % vzorků psů a 62,5 % vzorků koček. Přibližně stejná čísla uvádí i ostatní zmiňované studie.

Úplně odlišný výsledek přinesla studie z Brazílie z roku 2021 (70), kde měli ze 121 testovaných vzorků pouze 19 % pozitivních na *C. canimorsus*. Ve studii není tato nižší hodnota odůvodněna. Pouze se odkazují na články, kde se uvádí prevalence *C. canimorsus* v rozmezí 3–74 %. Takové rozmezí je sice v některých publikacích uváděno, ale spadají do něj také kultivační metody, u kterých bylo potvrzeno, že je záchyt výrazně nižší. Ve studii byly použity stejné primery, jako v této práci, ale vzorky byly sbírány pouze od psů, kteří trpěli paradontózou. Je tedy možné, že v souvislosti s tímto onemocněním, může být u těchto psů nižší prevalence *C. canimorsus*. Podrobnějším vysvětlením se ale studie nezabývala.

Alje P. Van Dam testovala ve své studii v roce 2009 jednotlivé kmeny rodu *Capnocytophaga*. Studie se věnuje porovnání různých metod diagnostiky a zaměřuje se také na testování pomocí real-time PCR. Přestože byl dle článku použit zcela jiný postup pro optimalizaci (jiné primery, teplotní programy i master mixy), tak výsledky byly srovnatelné jak s touto prací, tak s ostatními studiemi. Celkem bylo uvedeno, že zachytili 73 % pozitivních vzorků na *C. canimorsus*. Toto číslo je nepatrně vyšší a v článku také uvádějí, že odběr probíhal dvěma způsoby – odběrovým tampónem z jazyka a z dásně. Nepatrně vyšší pozitivitu vykazovaly vzorky odebrané z jazyka. Ale vzhledem k tomu, že nemají od stejného zvířete provedeny dva různé odběry, tak nelze dokázat, zda to mohlo nějak ovlivnit výsledky. K izolaci bakteriální DNA byla také zvolena komerční souprava od QIAGEN, která byla v článku porovnána s automatickým izolačním strojem a výsledky byly téměř totožné. I v této práci se izolace na kolonkách pomocí komerčně dodávané soupravy ukázala jako vhodně zvolená.

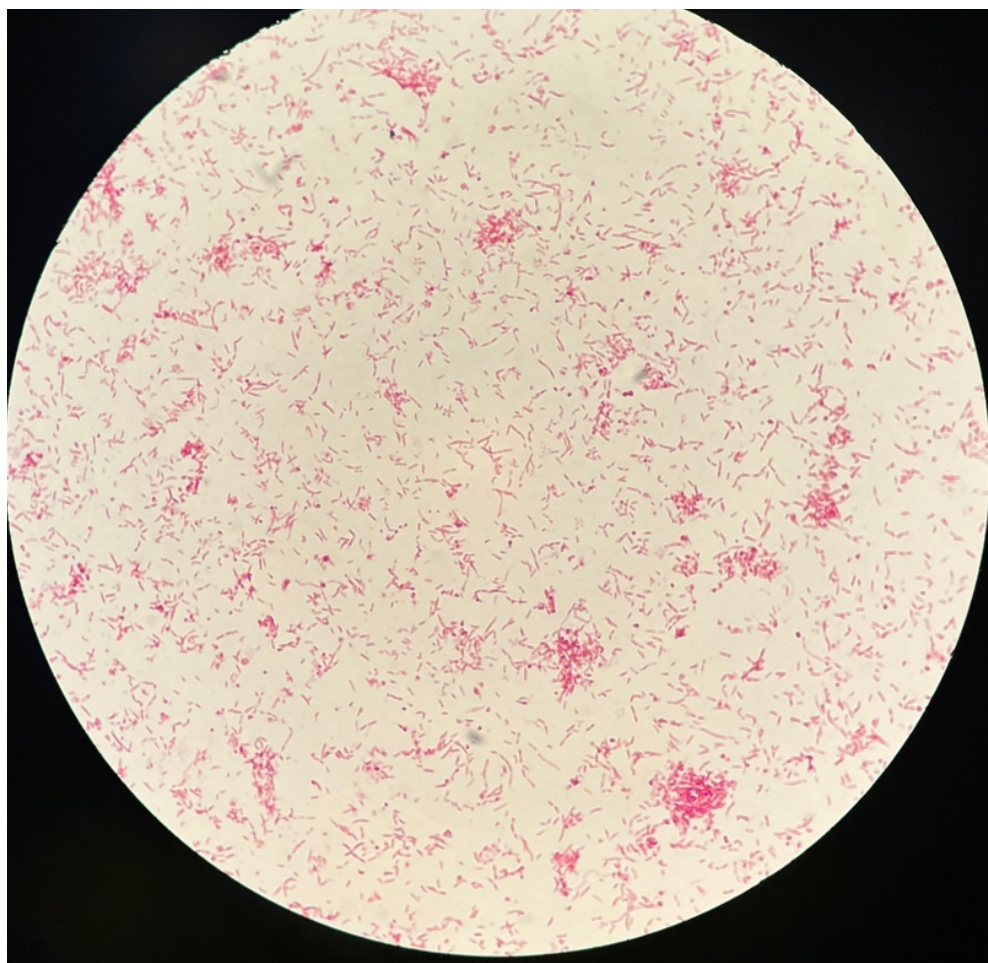
Patrné rozdíly v této diplomové práci jsou v pozitivních vzorcích jednotlivých pohlaví psů a koček. Celkově bylo z 50 psích vzorků 77,78 % pozitivních fen a 63 % pozitivních psů. U koček je statistika celkem podobná. Ze 34 pozitivních vzorků bylo 55 % pozitivních kocourů a 64,29 % koček. Ačkoliv některé články mají v tabulkách uvedeny velmi podobné výsledky, tak tuto skutečnost nezmiňují a nebylo nalezeno žádné důvodné vysvětlení proč je více pozitivních fen a koček než opačného pohlaví. Aby bylo možné udělat nějaký závěr, bylo by potřeba otestovat metodu na více vzorcích a sbírat podrobnější údaje o zvířatech. Z kapacitních možností veterinárních klinik byly vyžadovány pouze údaje o pohlaví a datu odběru. Nebyl tedy zjišťován klinický stav zvířete, věk, a ani zda žije venku nebo doma. Taková statistika nebyla cílem práce.

## 5.4 VÝSLEDKY KULTIVACE A IZOLACE

*Capnocytophaga canimorsus* roste velmi pomalu, proto první odečty probíhaly nejdříve za 48 hodin. Bakterie tvoří velmi malé kolonie a vzhledem k rozmanité mikroflóře v ústní dutině psů a koček nejsou tyto kolonie vždy na první pohled patrné. Proto samotná kultivace k přesnému určení původce nestačila. Suspektní kolonie byly přeočkovávány na nové Petriho misky s předem připraveným obohaceným krevním agarem tak dlouho, dokud nebylo patrné, že se jedná o sledovanou bakterii. Taková identifikace ale může zabrat týdny a při častém přeočkovávání může docházet k chybám a kontaminacím.

I přes zvýšení koncentrace gentamicinu v krevním agaru z původních 20 µg/ml na dvojnásobné množství, tedy 40 µg/ml, se celkově ze 40 vzorků povedlo jen dvakrát vyizolovat čistou kulturu, a to pouze u vzorků psů. U koček se nepodařilo čistou kulturu vyizolovat ani jednou. Podle dostupných publikací je náročná kultivace u bakterie *Capnocytophaga canimorsus* ten největší problém. Například Hannon et al. ve své publikaci z roku 2020 uvádí, že se jim bakterii podařilo vykultivovat pouze ve 25,5 % případech psů a v 15 % případech koček. Další velké výzkumy, které byly v souvislosti s diagnostikou této bakterie prováděny (Mally 2009, Umeda 2014 a Suzuki 2010) se kultivaci nevěnovali vůbec, pouze zmiňovali, že podle uváděných statistik se bakterii podaří vykultivovat ve 22–25 % případech. Ve všech člancích se jednoznačně shodli, že kultivace bakterie *Capnocytophaga canimorsus* je velmi obtížná a komplikovaná a věnují se tak diagnostice pomocí molekulárně biologických metod.

Několik podezřelých přeočkových vzorků bylo také obarveno dle Grama a pozorováno pod mikroskopem (Obr. 15). U některých byly na první pohled patrné gramnegativní tyčinky, které mohly být podle charakteristického vzhledu kolonií na krevním agaru a mikroskopie právě *Capnocytophaga canimorsus*. Stoprocentní pozitivita byla potvrzena až PCR reakcí.



**Obrázek 15** *Capnocytophaga canimorsus* barvená dle Grama (Obrázek z archivu autora)

## 6 ZÁVĚR

Diplomová práce se zaměřuje na identifikaci *Capnocytophaga canimorsus* metodou polymerázové řetězové reakce. Teoretická část se nejprve věnuje popisu obecné charakteristiky celého bakteriálního rodu a konkrétněji pak popisu *C. canimorsus*, jakožto lidského oportunního patogenu, běžně se vyskytujícího v ústní mikroflóře psů a koček. V druhé části teorie jsou popsány možnosti identifikace pomocí MALDI-TOF, sekvenace nukleové kyseliny a PCR.

Kultivací na krevním agaru s 10% sterilní beraní krve a gentamicinem bylo ověřeno, že bakterie vyžaduje velmi náročné podmínky k růstu a její pozitivitu tak touto metodou nelze ve většině případů odhalit. Z tohoto důvodu byla pro detekci a identifikaci zavedena a optimalizována metoda real-time PCR. Nejprve s použitím sbírkové kultury *C. canimorsus* byly vhodně zvoleny primery a master mix, poté byl optimalizován teplotní program a metoda izolace vzorku. To vše bylo ověřeno testy senzitivity a specifity. Pro účely stanovení specifity bylo použito 6 běžně se vyskytujících mikroorganismů, včetně *Capnocytophaga cynodegmi*, která je *C. canimorsus* fenotypově nejpodobnější.

Celkem bylo v této práci otestováno 84 reálných vzorků psů a koček a z celkového počtu jich bylo 64,29 % pozitivních na přítomnost bakterie *C. canimorsus*. 50 vzorků pocházelo od psů a z nich bylo celkově 68 % pozitivních. Koček bylo 34 a z nich pozitivních 58,8 %.

Získané výsledky ukazují, že tradiční kultivační metody nejsou pro identifikaci *Capnocytophaga canimorsus* dostatečné a v případě diagnostiky této bakterie je na místě využití molekulárně biologických metod. Vysoké procento pozitivních vzorků také poukazuje na to, že v případě pokousání, poškrábání nebo jiným kontaktem poraněné kůže se slinami psů a koček, je potřeba uvažovat o této bakterii. Především u lidí s oslabeným imunitním systémem hrozí po kontaktu se zvířecími slinami pozitivními na *C. canimorsus* zvýšené riziko propuknutí systémové infekce. Aby se tomuto riziku zabránilo, je potřeba včas a správně bakterii diagnostikovat a zahájit vhodnou léčbu.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BUTLER, T. *Capnocytophaga canimorsus*: an emerging cause of sepsis, meningitis, and post-splenectomy infection after dog bites. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. 2015, 34(7), 1271-1280. ISSN 0934-9723.
2. JANDA, J. Michael, Margot H. GRAVES, David LINDQUIST a Will S. PROBERT. Diagnosing *Capnocytophaga canimorsus* Infections. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2006, 12(2), 340-342. ISSN 1080-6040.
3. HANNON, D. M., E. HARKIN, K. DONNACHIE, S. SIBARTIE, M. DOYLE a G. CHAN. A case of *Capnocytophaga canimorsus* meningitis and bacteraemia. *Irish Journal of Medical Science* (1971 -) [online]. 2020, 189(1), 251-252. ISSN 0021-1265.
4. HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-844-4.
5. NISI, Fulvio, Andrea DIPASQUALE, Elena COSTANTINI, Enrico GIUSTINIANO, Umberto RIPANI a Maurizio CECCONI. Surviving *Capnocytophaga canimorsus* Septic Shock: Intertwining a Challenging Diagnosis with Prompt Treatment. *Diagnostics* [online]. 2022, 12(2). ISSN 2075-4418.
6. SUZUKI, Michio, Masanobu KIMURA, Koichi IMAOKA a Akio YAMADA. Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. *Veterinary Microbiology* [online]. 2010, 144(1-2), 172-176. ISSN 03781135.
7. CIANTAR, Marilou, Mark S. GILTHORPE, Steven J. HUREL, Hubert N. NEWMAN, Michael WILSON a David A. SPRATT. *Capnocytophaga* spp. in Periodontitis Patients Manifesting Diabetes Mellitus. *Journal of Periodontology* [online]. 2005, 76(2), 194-203. ISSN 0022-3492.
8. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [online]. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=capnocytophaga>. [Online]

9. MANFREDI, Pablo, Francesco RENZI, Manuela MALLY, Loïc SAUTEUR, Mathias SCHMALER, Suzette MOES, Paul JENÖ a Guy R. CORNELIS. The genome and surface proteome of *Capnocytophaga canimorsus* reveal a key role of glycan foraging systems in host glycoproteins deglycosylation. *Molecular Microbiology* [online]. 2011, 81(4), 1050-1060 ISSN 0950382X.
10. PIAU, Caroline, Cédric ARVIEUX, Martine BONNAURE-MALLET a Anne JOLIVET-GOUGEON. *Capnocytophaga* spp. involvement in bone infections: a review. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2013, 41(6), 509-515. ISSN 09248579.
11. ANSEN, Megan a Nancy F. CRUM-CIANFLONE. *Capnocytophaga canimorsus* Meningitis: Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction Testing and Systematic Review of the Literature. *Infectious Diseases and Therapy* [online]. 2019, 8(1), 119-136. ISSN 2193-8229.
12. LION, C., F. ESCANDE a J.C. BURDIN. *Capnocytophaga canimorsus* infections in human: Review of the literature and cases report. *European Journal of Epidemiology* [online]. 1996, 12(5), 521-533. ISSN 0392-2990.
13. TANABE, Katsuyuki, Shugo OKAMOTO, Sumie HIRAMATSU ASANO a Jun WADA. *Capnocytophaga canimorsus* peritonitis diagnosed by mass spectrometry in a diabetic patient undergoing peritoneal dialysis: a case report. *BMC Nephrology* [online]. 2019, 20(1). ISSN 1471-2369.
14. FELIX, Logan, Amy ROSENBERG, Karina Auffant CARABALLO, Deborah Patricia TABORGA a Camille HAMULA. *Capnocytophaga* spp. infection causing chorioamnionitis: an unusual suspect. *Anaerobe* [online]. 2019, 59, 115-117. ISSN 10759964.
15. ZANGENAH, S., V. ÖZENCI, S. BORÄNG a P. BERGMAN. identification of blood and wound isolates of *C. canimorsus* and *C. cynodegmi* using VITEK2 and MALDI-TOF. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. 2012, 31(10), 2631-2637 . ISSN 0934-9723.
16. BRENNER, D J, D G HOLLIS, G R FANNING a R E WEAVER. *Capnocytophaga canimorsus* sp. nov. (formerly CDC group DF-2), a cause of septicemia following dog bite, and *C. cynodegmi* sp. nov., a cause of localized wound infection following dog bite. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1989, 27(2), 231-233. ISSN 0095-1137.
17. BUTLER, THOMAS. Unidentified Gram-Negative Rod Infection. *Annals of Internal Medicine* [online]. 1977, 86(1). ISSN 0003-4819.

18. FULTON, Kelly M. a Susan M. TWINE, ed. MCCOMB, Scott, Aude THIRIOT, Bassel AKACHE, Lakshmi KRISHNAN a Felicity STARK. Introduction to the Immune System. Immunoproteomics [online]. New York, NY: Springer New York, 2019, 2019-07-31, s. 1-24. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-9596-7.
19. MEYER, Salome, Hwain SHIN a Guy R. CORNELIS. *Capnocytophaga canimorsus* resists phagocytosis by macrophages and blocks the ability of macrophages to kill other bacteria. Immunobiology [online]. 2008, 213(9-10), 805-814. ISSN 01712985.
20. RAUTAVA, Samuli, Maria Carmen COLLADO, Seppo SALMINEN a Erika ISOLAURI. Probiotics Modulate Host-Microbe Interaction in the Placenta and Fetal Gut: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Neonatology [online]. 2012, 102(3), 178-184. ISSN 1661-7819.
21. SHIN, Hwain, Manuela MALLY, Marina KUHN, Cecile PAROZ a Guy R. CORNELIS. Escape from Immune Surveillance by *Capnocytophaga canimorsus*. The Journal of Infectious Diseases [online]. 2007, 195(3), 375-386. ISSN 0022-1899.
22. MALLY, Manuela, Cécile PAROZ, Hwain SHIN, Salome MEYER, Lavinia V. SOUSSOULA, Ueli SCHMIEDIGER, Caroline SAILLEN-PAROZ a Guy R. CORNELIS. Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* in dogs and occurrence of potential virulence factors. Microbes and Infection [online]. 2009, 11(4), 509-514. ISSN 12864579.
23. RENZI, Francesco, Ulrich ZÄHRINGER, Courtney E. CHANDLER, Robert K. ERNST, Guy R. CORNELIS, Simon J. ITTIG a S. M. PAYNE. Modification of the 1-Phosphate Group during Biosynthesis of *Capnocytophaga canimorsus* Lipid A. Infection and Immunity [online]. 2016, 84(2), 550-561. ISSN 0019-9567.
24. JOLIVET-GOUGEON, Anne, Nicolas HELSENS, Elise RENARD, Zohreh TAMANAI-SHACOORI a Martine BONNAURE-MALLET. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of human oral *Capnocytophaga* species. Anaerobe [online]. 2017, Sv. 48, 89-93. ISSN 10759964.
25. HUNDERTMARK, Moritz, Tatjana WILLIAMS, Anja VOGEL, Maria MORITZ, Peter BRAMLAGE, Nikolaos PAGONAS, Oliver RITTER a Benjamin SASKO. *Capnocytophaga canimorsus* as Cause of Fatal Sepsis. Case Reports in Infectious Diseases [online]. 2019, 2019, 1-3. ISSN 2090-6625.



26. HEXTER, Madison A. An uncommon cause of sepsis following dog exposure. *Journal of the American Academy of Physician Assistants* [online]. 2021, 34(1), 1-4. ISSN 1547-1896.
27. GAASTRA, Wim a Len J.A. LIPMAN. *Capnocytophaga canimorsus*. *Veterinary Microbiology* [online]. 2010, 140(3-4), 339-346. ISSN 03781135.
28. GOETZINGER, John C., Austin L. LAGROW, Dena R. SHIBIB, Sharanjeet K. THIND a Mohamed DKHIL. *Capnocytophaga canimorsus* Bloodstream Infection Associated with an Urticarial Exanthem. *Case Reports in Infectious Diseases* [online]. 2021, 2021, 1-4. ISSN 2090-6633.
- 29 VAN DAM, Alje P., Angela VAN WEERT, Celine HARMANUS, K. Emiel HOVIUS, Eric C. J. CLAAS a Frans A. G. REUBSAET. Molecular Characterization of *Capnocytophaga canimorsus* and Other Canine *Capnocytophaga* spp. and Assessment by PCR of Their Frequencies in Dogs. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2009, 47(10), 3218-3225. ISSN 0095-1137.
30. RÚA GONZÁLVEZ, Laura, Luis Manuel JUNQUERA GUTIÉRREZ, Paula DONATE PÉREZ DEL MOLINO, Jesús GONZÁLEZ SOTO, Juan Luis COBO DÍAZ a Juan Carlos VICENTE RODRÍGUEZ. Keratocyst *Capnocytophaga* superinfection. *Gerodontology* [online]. 2018, 36(1), 85-87. ISSN 0734-0664.
- 31 TSUNODA, Hideki, Hidetomo NOMI, Kunihiko OKADA a Tsuneaki KENZAKA. Clinical course of *Capnocytophaga canimorsus* bacteremia from acute onset to life crisis. *Clinical Case Reports* [online]. 2021, 9(1), 266-268. ISSN 2050-0904.
32. VIGNON, G., P. COMBEAU, J. VIOLETTE, A.-S. COGNÉE, S. MÉGLIO, F. CARRÈRE, P. AUCHER a F. LELLOUCHE. Infection fulminante fatale à *Capnocytophaga canimorsus* : à propos d'un cas et revue de la littérature. *La Revue de Médecine Interne* [online]. 2018, 39(10), 820-823. ISSN 02488663.
33. PIAU, Caroline, Cédric ARVIEUX, Martine BONNAURE-MALLET a Anne JOLIVET-GOUGEON. *Capnocytophaga* spp. involvement in bone infections: a review. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2013, 41(6), 509-515. ISSN 09248579.
34. YUAN, Lei, Yu ZHAO a Xue-Long SUN. Sialidase substrates for Sialdiase assays - activity, specificity, quantification and inhibition. *Glycoconjugate Journal* [online]. 2020, 37(5), 513-531. ISSN 0282-0080.

35. HANSEN, Megan a Nancy F. CRUM-CIANFLONE. *Capnocytophaga canimorsus* Meningitis: Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction Testing and Systematic Review of the Literature. *Infectious Diseases and Therapy* [online]. 2019, 8(1), 119-136. ISSN 2193-8229.
36. MADER, Naomi, Fabian LÜHRS, Martin LANGENBECK a Stefan HERGET-ROSENTHAL. *Capnocytophaga canimorsus* – a potent pathogen in immunocompetent humans – systematic review and retrospective observational study of case reports. *Infectious Diseases* [online]. 2020, 52(2), 65-74. ISSN 2374-4235.
37. WOŹNIAK, Piotr, Robert SZYMCZAK a Agata PIOTROWSKA. A case of fulminant sepsis caused by *Capnocytophaga canimorsus* after a dog bite. *IDCases* [online]. 2020, 21. ISSN 22142509.
38. PRASIL, Petr, Lenka RYSKOVA, Stanislav PLISEK a Pavel BOSTIK. A rare case of purulent meningitis caused by *Capnocytophaga canimorsus* in the Czech Republic – case report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases* [online]. 2020, 20(1). ISSN 1471-2334.
39. SLABÝ, Ondřej. *Molekulární medicína*. Praha: Galén, c2015. ISBN 978-80-7492-121-6.
40. ASIF, Abuzar A., Moni ROY, Benjamin R. TELLIER a Sharjeel AHMAD. *Capnocytophaga canimorsus* meningitis diagnosed using next- generation sequencing of microbial cell-free DNA. *IDCases* [online]. 2021, 24 ISSN 22142509.
41. JANNETTO, Paul J. a Darlington DANSO. Mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* [online]. 2020, 82. ISSN 00099120.
42. TSUCHIDA, Sachio, Hiroshi UMEMURA a Tomohiro NAKAYAMA. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. *Molecules* [online]. 2020, 25(20) . ISSN 10219498.
43. OVIAÑO, Marina a Belén RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [online]. 2021, 39(4), 192-200. ISSN 0213005X.
44. MAGNETTE, Amandine, Te-Din HUANG, Francesco RENZI, Pierre BOGAERTS, Guy R. CORNELIS a Youri GLUPCZYNSKI. Improvement of identification of *Capnocytophaga canimorsus* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using enriched database. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 2016, Sv. 4(1), 12-15. ISSN 07328893.

45. HOU, Tsung-Yun, Chuan CHIANG-NI a Shih-Hua TENG. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2019, 27(2), 404-414. ISSN 10219498.
46. ŠTĚPÁNOVÁ, Vlasta, Lenka PLÍŠKOVÁ a Kateřina HROCHOVÁ. Využití metod molekulární biologie v diagnostice infekcí dětského věku. *Pediatric pro praxi*. SOLEN, 2002, 2002(3), 103-105.
- 47 PHAM, John, Brian PLOSKY, Allyson EVANS, Miao-Chih TSAI, Nicole NEUMAN a Julie SOLLIER. 20 Years of Shaping Molecular Biology. *Molecular Cell* [online]. 2018, 71(3) ISSN 10972765.
48. MULLEGAMA, Sureni V., Michael O. ALBERTI, Cora AU, Yan LI, Traci TOY, Vanina TOMASIAN a Rena R. XIAN. Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2019, 2019-12-12, s. 359-383. ISBN 978-1-4939-8933-1.
49. TAN, Siun Chee a Beow Chin YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2009, 2009, 1-10 ISSN 1110-7243.
50. BRONKHORST, Abel Jacobus, Vida UNGERER a Stefan HOLDENRIEDER. Comparison of methods for the isolation of cell-free DNA from cell culture supernatant. *Tumor Biology* [online]. 2020, 42(4). ISSN 1010-4283.
51. PAUL, Rajesh, Emily OSTERMANN a Qingshan WEI. Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2020, 169 . ISSN 09565663.
- 52 DIEFENBACH, Russell J., Jenny H. LEE, Richard F. KEFFORD a Helen RIZOS. Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA. *Cancer Genetics* [online]. 2018, 228-229, 21-27. ISSN 22107762.
53. LEVY, Shawn E. a Braden E. BOONE. Next-Generation Sequencing Strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2019, 9(7). ISSN 2157-1422.
54. VAN DIJK, Erwin L., Yan JASZCZYSZYN, Delphine NAQUIN a Claude THERMES. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics* [online]. 2018, 34(9), 666-681. ISSN 01689525.

55. LONG, Keyi, Lei CAI a Lin HE. DNA Sequencing Data Analysis. HUANG, Tao, ed. Computational Systems Biology [online]. Methods in Molecular Biology New York, NY: Springer New York, 2018, 2018, s. 1-13. ISBN 978-1-4939-7716-1.
56. First complete gap-free human genome sequence published | Genetics | The Guardian. [online]. Copyright ©. Dostupné z: <https://www.theguardian.com/science/2022/mar/31/first-complete-gap-free-human-genome-sequence-published>.
57. RUIZ-GARCIA, Erika a Horacio ASTUDILLO-DE LA VEGA, ed. MORGANTI, Stefania, Paolo TARANTINO, Emanuela FERRARO, Paolo D'AMICO, Bruno Achutti DUSO a Giuseppe CURIGLIANO. Next Generation Sequencing (NGS): A Revolutionary Technology in Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Cancer. Translational Research and Oncomics Applications in the Era of Cancer Personal Genomics [online]. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2019, 2019-11-12, s. 9-30. ISBN 978-3-030-24099-8.
58. GREEN, Michael R. a Joseph SAMBROOK. Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Protocols [online]. 2019, 2019(6). ISSN 1940-3402.
59. STÅHLBERG, Anders a Mikael KUBISTA. Technical aspects and recommendations for single-cell qPCR. Molecular Aspects of Medicine [online]. 2018, 59, 28-35. ISSN 00982997.
60. ZUCHA, Daniel, Mikael KUBISTA a Lukas VALIHRACH. Tutorial: Guidelines for Single-Cell RT-qPCR. Cells [online]. 2021, 10(10). ISSN 2073-4409.
61. GREEN, Michael R. a Joseph SAMBROOK. Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR). Cold Spring Harbor Protocols [online]. 2018(5). ISSN 1940-3402.
62. GREEN, Michael R. a Joseph SAMBROOK. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). Cold Spring Harbor Protocols [online]. 2018, 2018(5) ISSN 1940-3402.
63. GREEN, Michael R. a Joseph SAMBROOK. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). Cold Spring Harbor Protocols [online]. 2019, 2019(2). ISSN 1940-3402.
64. HSU, Benjamin, Valeriia SHERINA, Matthew N. McCALL a Kelso JANET. Autoregressive modeling and diagnostics for qPCR amplification. Bioinformatics [online]. 2020, 36(22-23), 5386-5391. ISSN 1367-4803.

65. KADJA, Tchamie, Chengkun LIU, Yvonne SUN a Vamsy P. CHODAVARAPU. Low-Cost, Real-Time Polymerase Chain Reaction System for Point-of-Care Medical Diagnosis. *Sensors* [online]. 2022, 22(6). ISSN 1424-8220.
66. LOAN, Thomas D., Christopher J. EASTON a Apostolos ALISSANDRATOS. DNA amplification with in situ nucleoside to dNTP synthesis, using a single recombinant cell lysate of *E. coli*. *Scientific Reports* [online]. 2019, 9(1). ISSN 2045-2322.
67. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook - EN - QIAGEN [online]. Copyright © QIAGEN 2013 [cit. 16.03.2022]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>
68. Izolace DNA | doba-genova.cz. doba-genova.cz [online]. Copyright © 2022 doba. Dostupné z: <https://doba-genova.cz/izolace-dna/>
69. TABATABAEI, Mohammad a Hamid Reza ROUHANI. Polymerase Chain Reaction Detection of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* as the Emerging Zoonosis. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2019, 6(1), 21-25. ISSN 2383-0298.
70. NOGUEIRA, Beatriz Silva, Andresa de Cássia MARTINI, Isabela de Godoy MENEZES, Roberto Lopes de SOUZA, Fernanda Harumi MARUYAMA, Juliana Yuki RODRIGUES, Luciano NAKAZATO a Valéria DUTRA. Detection of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs with periodontal disease of Brazil. *Research, Society and Development* [online]. 2021, 10(13). ISSN 2525-3409.
71. HANSEN, Megan a Nancy F. CRUM-CIANFLONE. *Capnocytophaga canimorsus* Meningitis: Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction Testing and Systematic Review of the Literature. *Infectious Diseases and Therapy* [online]. 2019, 8(1), 119-136. ISSN 2193-8229.
72. KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>