

Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave
Fakulta zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici

10691

**Využitie molekulárno-biologických metód v diagnostike
pneumokokových infekcií**

Bakalárska práca

2017

Radoslava Gogol'ová

Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave
Fakulta zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici

**Využitie molekulárno-biologických metód v diagnostike
pneumokokových infekcií**

Bakalárska práca

Študijný program: Laboratórne vyšetrovacie metódy v zdravotníctve
Študijný odbor: 7.4.3 laboratórne vyšetrovacie metódy v zdravotníctve
Školiace pracovisko: Národné referenčné centrum pre pneumokokové a
hemofilové nákazy
Školiteľ: RNDr. Edita Bottková, PhD.

Banská Bystrica 2017

Radoslava Gogol'ová



SLOVENSKÁ ZDRAVOTNÍCKA UNIVERZITA v Bratislave

Fakulta zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici

Katedra laboratórných vyšetrovacích metód v zdravotníctve FZ SZU

Z A D A N I E Z Á V E R E Č N E J P R Á C E

Evidenčné číslo: 10691

Názov záverečnej práce:

Využitie molekulárno-biologických metód v diagnostike pneumokokových infekcií

Pokyny pre vypracovanie: Cieľom záverečnej práce je spracovanie poznatkov o dostupných molekulárno-biologických metódach používaných pri diagnostike pneumokokových infekcií ako aj zhodnotenie využitia molekulárno-biologických metód, ktoré sú v súčasnosti dostupné na Slovensku v rámci Národného referenčného centra pre pneumokokové a hemofilové nákazy.

Študijný odbor: 7.4.3. laboratórne vyšetrovacie metódy v zdravotníctve

Študijný program: laboratórne vyšetrovacie metódy v zdravotníctve

Typ záverečnej práce: Bakalárska práca Bc.

Akademický rok: 2016/2017

Autor záverečnej práce: Radoslava Gogoľová

Vedúci záverečnej práce: RNDr. Edita BOTTKOVÁ

Konzultant záverečnej práce:

Dátum zadania záverečnej práce: 27.06.2016

Čestné prehlásenie

Čestne prehlasujem, že bakalársku prácu som napísala samostatne, pod odborným vedením školiteľa práce a na základe štúdia odbornej literatúry.

Banská Bystrica

.....

Radoslava Gogoľová

Pod'akovanie

Ďakujem mojej školiteľke RNDr. Edite Bottkovej, PhD. za odborné vedenie, konzultácie, rady a informácie, ktoré mi poskytla pri vypracovaní práce.

Abstrakt

Radoslava Gogoľová: Využitie molekulárno-biologických metód v diagnostike pneumokokových infekcií.

Slovenská zdravotnícka univerzita. Fakulta zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici.

Bakalárska práca, 46 strán, 2017

Cieľom bakalárskej práce je spracovať poznatky o baktérii *Streptococcus pneumoniae* a molekulárno-biologických metódach používaných pri diagnostike pneumokokových infekcií, na čo je práca zameraná v teoretickej časti. V tejto časti sú popísané základné charakteristiky pneumokoka ako morfológia a antigénna štruktúra.. Okrem toho sa práca venuje aj ochoreniam, ktoré *S. pneumoniae* spôsobuje, ich patogenéze, epidemiológii, terapii a prevencii. Teoretická časť je taktiež zameraná na popis niektorých genetických vlastností a na laboratórnu diagnostiku so zameraním na molekulárno-biologické metódy.

V praktickej časti sa práca venuje opakovanému stanoveniu sérotypu 10 vzoriek, ktoré bolo vykonané multiplexnou PCR (polymerázová reťazová reakcia). Pôvodné stanovenie v Národnom referenčnom centre pre pneumokokové a hemofilové nákazy bolo prevedené pomocou sérologických metód. Práca hodnotí využitie multiplexnej PCR v rámci diagnostiky a sérotypizácie *S. pneumoniae* a porovnáva moderné molekulárno-biologické metódy diagnostiky s klasickými sérologickými metódami.

Kľúčové slová: *Streptococcus pneumoniae*, sérotypizácia, diagnostika, PCR, multiplexná PCR

Abstract

Radoslava Gogol'ová: The use of molecular-biological methods in pneumococcal infections diagnostics.

Slovak Medical University. Faculty of Health in Banská Bystrica.

Bachelor's Thesis, 46 pages, 2017

The bachelor's thesis is aimed at processing knowledge of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* and of application of molecular–biological methods to pneumococcal infections diagnostics. These topics are addressed in the theoretical section of the thesis that also describes fundamental characteristics of *pneumococcus*, e.g. morphology and antigen structure. Moreover, the thesis also deals with diseases caused by *S. pneumoniae*, their pathogenesis, epidemiology, therapy and prevention. Theoretical section also deals with the description of some genetic features and laboratory diagnostics, focused on molecular–biological methods.

Practical section of the thesis is dedicated to repeated determination of serotype of 10 samples, performed by multiplex PCR (polymerase chain reaction). Originally, the serotype was determined at the National Reference Center of Pneumococcal and Hemophilic Infections with serological methods. The thesis provides evaluation of the multiplex PCR application within *S. pneumoniae* diagnostics and serotyping, and also compares advanced molecular-biological diagnostic methods with classical serology methods.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, serotyping, diagnostics, PCR, multiplex PCR

Obsah

1.	Úvod.....	10
2.	Charakteristika <i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
2.1	Morfológia.....	12
2.2	Antigénna štruktúra.....	13
2.3	Epidemiológia	13
2.4	Patogenéza pneumokokových ochorení.....	14
2.5	Antibiotická rezistencia.....	16
2.6	Prevenca	17
3.	Genetické vlastnosti <i>S. pneumoniae</i>	18
3.1	Genóm <i>S. pneumoniae</i>	18
3.2	Rekombinácia.....	18
3.3	Medzibakteriálna výmena DNA	19
3.4	Genetika sérotypov a séroskupín	19
4	Základná diagnostika	21
4.1	Kultivácia	21
4.2	Gramovo farbenie a mikroskopia.....	21
4.3	Základné diferenciuálne-diagnostické testy.....	22
5	Nadstavbová diagnostika	23
5.1	Sérologické metódy.....	23
5.2	Molekulárno-biologické metódy.....	23
5.2.1	Polymerázová reťazová reakcia.....	24
5.2.1.1	Postup PCR	24
5.2.2	Multiplexná PCR	26
5.2.2.1	Multiplexná PCR využívaná v NRC	26
5.2.3	Nové molekulárno-biologické metódy	26
5.2.3.1	Multilocus Sequence Typing analysis (MLST)	26
5.2.3.2	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA).....	27
5.2.3.3	Whole Genome Sequencing (WGS)	27
5.2.3.4	Pulsed-Field Gel Electrophoresis typing (PFGE)	27
6	Materiál a metódy	29
6.1	Materiál	29
6.1.1	Testovaný súbor.....	29
6.1.2	Materiál potrebný na skupinovú a špecifické mPCR.....	29
6.1.3	Materiál potrebný na gélovú agarózovú elektroforézu.....	29

6.2	Metódy	30
6.2.1	Skupinová multiplexná PCR.....	31
6.2.2	Špecifické multiplexné PCR - základné a pokračovacie	32
6.2.3	Agarózová gélová elektroforéza	34
7	Výsledky	35
7.1	Výsledky skupinovej mPCR	35
7.2	Výsledky špecifických mPCR.....	36
8	Diskusia	38
9	Záver	41
10	Zoznam použitej literatúry	42

Zoznam skratiek

ATB – antibiotiká

bp – bázoové páry

dsDNA – dvojvláknová DNA

HIV – Human Immunodeficiency Virus

IPO – invazívne pneumokokové ochorenia

MIC – minimálna inhibičná koncentrácia

MLST – Multilocus Sequence Typing analysis

MLVA – Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis

mPCR – multiplexná polymerázová reťazová reakcia

NRC – Národné referenčné centrum pre pneumokokové a hemofilové nákazy

PCR – polymerase chain reaction

PFGE – Pulsed-Field Gel Electrophoresis typing

ssDNA – jednovláknová DNA

WGS – Whole Genome Sequencing

WHO – World Health Organization

1. Úvod

Streptococcus pneumoniae je grampozitívny nepohyblivý kok. Vyskytuje sa v dvojiciach alebo krátkych reťazkách zložených z dvojíc kokov. Dvojice obklopuje široké puzdro. Je to fakultatívne anaeróbna baktéria, ktorá rastie na obohatených a dostatočne vlhkých pôdach. Typická pre rast pneumokokov na krvnom agare je alfa-hemolýza (Votava, 2003).

Pneumokoky sú v nevirulentnej forme súčasťou mikroflóry horných dýchacích ciest. Približne 10 – 30 % dospelých sú nosičmi pneumokokov na sliznici nosohltanu a mandlí. Zároveň však *S. pneumoniae* môže vystupovať ako významný oportúnny bakteriálny patogén. Spôsobuje neinvazívne ochorenia, ako napr. komunitná pneumónia, otitis media, sínusitída a konjunktivitída, a invazívne ochorenia, ako napr. meningitída, sepsa a pneumónia s bakteriémiou. Virulentné kmene vytvárajú na svojom povrchu polysacharidové puzdro, ktoré je hlavným faktorom virulencie. Na základe stavby puzdrového antigénu rozoznávame viac ako 90 sérotypov pneumokokov. Zo všetkých len približne 20 vyvoláva IPO (Kompaniková a kol., 2013).

Pneumokokové ochorenia predstavujú celosvetový zdravotnícky problém. Podľa WHO ročne zomrie na pneumokokové ochorenia horných dýchacích ciest 2,6 milióna detí vo veku do jedného roka. Aj napriek tomu, že pneumokokové ochorenia sú preventabilné očkovaním, patria medzi hlavné príčiny morbidita a mortality na svete (Maďar, 2004).

Na Slovensku je zavedené povinné plošné očkovanie 13-valentnou alebo 10-valentnou pneumokokovou konjugovanou vakcínou. Do očkovacieho kalendára bolo pridané v roku 2009 a poskytuje ochranu proti najbežnejšie sa vyskytujúcim invazívnym pneumokokovým ochoreniam. Dostupná je aj 23-valentná polysacharidová vakcína, ktorou sú očkovaní dospelí a deti od 2 rokov.

Diagnostika baktérie *S. pneumoniae* je založená na kultivácii a mikroskopii. Na odlíšenie od ostatných grampozitívnych baktérií sa používajú testy ako napr. katalázový test, optochínový test alebo rozpustnosť v žlči. K bezkultivačnému dôkazu pneumokokov sa využívajú molekulárno-biologické metódy. V Národnom referenčnom centre pre pneumokokové a hemofilové nákazy je zavedená polymerázová reťazová reakcia (PCR), pomocou ktorej je možné dokázať DNA *S. pneumoniae* priamo z biologického materiálu.

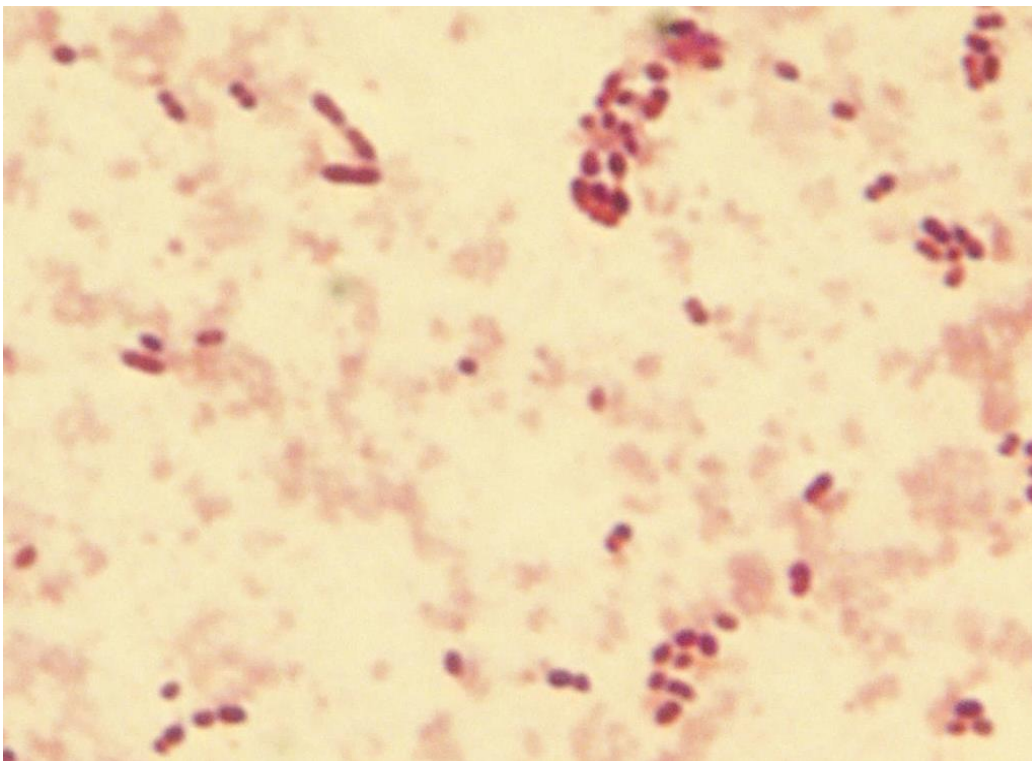
NRC zabezpečuje aj nadstavbovú diagnostiku – sérotypizáciu. Tá je vykonávaná pomocou sérologických a molekulárno-biologických metód. K sérologickým metódam patria latexová aglutinácia a quellung reakcia. Molekulárno-biologickou metódou, ktorú

NRC využíva na sérotypizáciu je multiplexná PCR (Bottková a kol., 2013). Metóda mPCR je technologicky náročná, ale má výhodu v možnosti stanovenia sérotypu nekultivovateľných vzoriek. Multiplexná PCR prispela k zdokonaleniu sérotypizácie pneumokokov. V súčasnosti sa na stanovenie sérotypu v NRC využívajú sérologické aj molekulárno-biologické metódy.

2. Charakteristika *Streptococcus pneumoniae*

2.1 Morfológia

Streptococcus pneumoniae je grampozitívny kok oválneho lancetovitého tvaru, s veľkosťou v priemere 0,5 – 1,25 μm . Na Obrázku 1 môžeme vidieť, že sa vyskytuje najmä v dvojiciach alebo krátkych reťazkách pospájaných do zhlukov. Dvojice kokov obklopuje nezafarbené puzdro. Sú nepohyblivé a nevytvárajú spóry. Pneumokoky sa rozmnožujú extracelulárne a dobre odolávajú fagocytóze za neprítomnosti protilátok (Bednář, 1996; Beran, 2008; Kompaníková a kol., 2013; Votava a kol., 2003).



Obrázok 1: Baktérie *S. pneumoniae* zafarbarené Gramovým farbením pod mikroskopom s 1000 násobným zväčšením.

Zdroj: vlastný obrázok

2.2 Antigénna štruktúra

Najdôležitejším antigénom pneumokoka je typovo špecifický kapsulárny polysacharidový antigén. Je protektívny a vytvárajú sa proti nemu protilátky. Je špecifický pre jednotlivé typy *S. pneumoniae*, na základe čoho je umožnená sérotypizácia pneumokokov. Na základe stavby kapsulárneho antigénu rozoznávame viac ako 90 sérotypov pneumokokov (Bednář, 1996; Beran, 2008; Votava a kol., 2003).

Hlavným faktorom virulencie *S. pneumoniae* je ich polysacharidové puzdro. Opuzdrené kmene sú vysoko virulentné, pričom kmene bez polysacharidového puzdra sú avirulentné a ľahko fagocytovateľné. Opuzdrený pneumokok je po opsonizácii protilátkou a komplementom fagocytovaný. Niektoré kapsulárne polysacharidy môžu aktivovať komplement alternatívnou cestou. Umožňuje to fagocytózu bez účasti špecifickej protilátky (Bednář, 1996; Votava a kol., 2003). Pneumokoky sú vybavené niekoľkými dôležitými invazínmi, ktoré sú zodpovedné za prienik do pľúc, krvného obehu a tkanív. Patria sem enzýmy hyaluronidáza a neuraminidáza. Ku invazínom patrí aj pneumokokový povrchový proteín A, ktorý bráni odstraňovaniu pneumokokov z krvného obehu. Vznik zápalu podporuje autolyzín a pneumolyzín (Bednář, 1996; Votava a kol., 2003).

2.3 Epidemiológia

Zdrojom pneumokokových infekcií je človek. Prameňom nákazy sú chorí a nosiči. Bezpríznakových nosičov je v populácii 10 – 30 % zo zdravých dospelých. Kolonizácia väčšinou pretrváva 2 - 4 týždne, po tomto období môže byť nahradená iným sérotypom. Nosičstvo je častejšie u detí v predškolskom veku a v zimných mesiacoch. Zdraví nosiči nevytvárajú proti pneumokokom protilátky, ale môžu byť zdrojom nákazy (Bazovská a kol., 2007; Beran, 2008). Nákaza sa šíri na vnímavých jedincov respiračnými sekrétmi infikovaných osôb vzduchom pri kýchaní a kašľaní. Kvapôčková infekcia sa najčastejšie prenáša pri úzkom styku v uzavretých kolektívoch, akým je napr. rodina, škôlka, škola, domov dôchodcov atď. Ku prepuknutiu ochorenia dôjde až keď baktérie prekonajú prirodzenú ochrannú bariéru respiračného traktu (Bazovská a kol., 2007; Beran, 2008; Votava a kol., 2003).

2.4 Patogenéza pneumokokových ochorení

Infekcie vyvolané baktériou *S. pneumoniae* predstavujú závažný celosvetový verejnozdravotnícky problém. Postihujú najčastejšie kojencov a detí do 2 rokov a dospelých starších ako 55 rokov. Výskyt jednotlivých typov ochorení je odlišný v rozvojových a rozvinutých krajinách, je ovplyvnený sociálnymi, ekonomickými podmienkami a geografickou polohou. Podľa údajov WHO ročne zomiera na pneumokokové infekcie približne 1 milión detí. Pneumónia zapríčinila až 16 % zo všetkých úmrtí detí do 5 rokov. Pre vznik pneumokokových ochorení majú význam aj rizikové faktory ako znížená imunita, ochorenia lymfatického systému, ochorenia pečene a obličiek, obštrukčná choroba pľúc, alkoholizmus a dekompenzovaná cukrovka (Bazovská a kol., 2007; Beran, 2008).

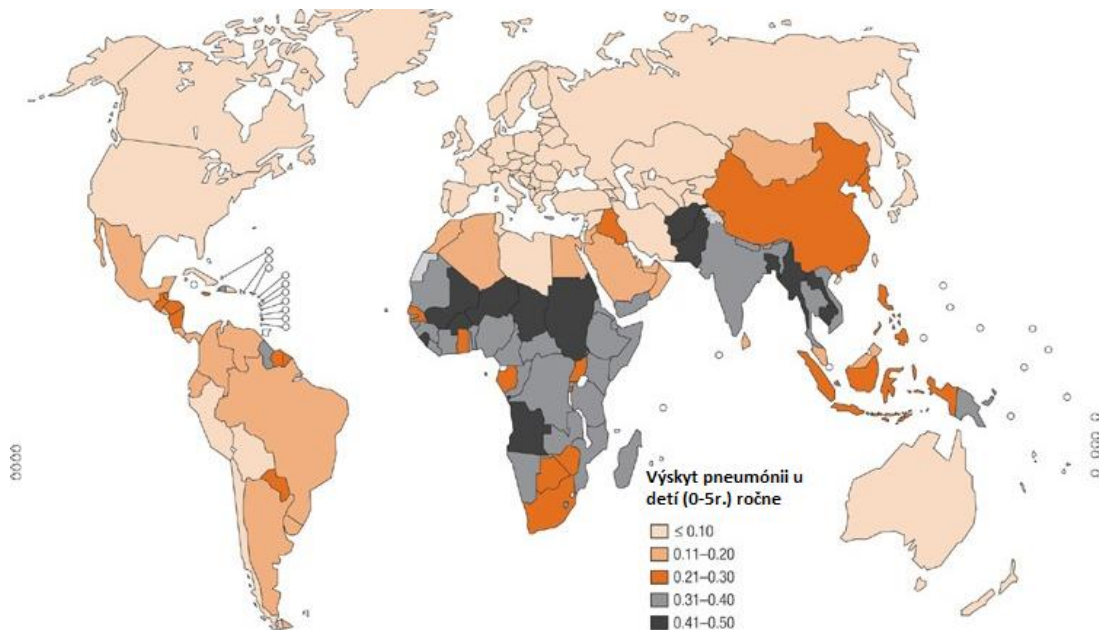
Ochorenia zapríčinené pneumokokmi sa delia na invazívne a neinvazívne. Medzi neinvazívne pneumokokové ochorenia patria sem sínusitída, otitída, bronchitída a nebakteriálne pneumónie. Vznikajú pri preniknutí baktérie cez riasinkový epitel slizníc do sterilných priestorov, kde vyvolajú zápal (Beran, 2008).

Akútny zápal stredného ucha (otitída) je veľmi častá bakteriálna infekcia a až 75 % detí ju prekonalo pred začatím školskej dochádzky. Deti sú náchylné k akútnemu zápalu stredného ucha, pretože čelia infekciám častejšie ako dospelí a majú kratšiu Eustachovu trubicu v porovnaní s dospelými. Hlavnou komplikáciou je prechod akútneho zápalu do chronického zápalu stredného ucha (Beran, 2008; www1).

Zápal prínosových dutín (sínusitída) je častejší u dospelých ako u detí. Zápal vzniká zvyčajne počas vírusovej infekcie alebo po alergickej reakcii. Patogénne baktérie nasadajú sekundárne na poškodenú sliznicu, kde majú vhodné podmienky pre rast a množenie. Bakteriálny zápal môže spôsobiť upchatie dutín (www2).

Pneumónia je jedným z najzávažnejších ochorení dolných dýchacích ciest. Postihuje všetky vekové skupiny, no najčastejšie deti do 5 rokov a dospelých nad 65 rokov (Beran, 2008). Môže mať formu primárneho ochorenia alebo ako superinfekcia po vírusovej infekcii. S týmto súvisí zvýšenie výskytu pneumónii v období epidémie chrípky. Riziko pneumónie je vyššie u vnímavých jedincov so zníženou obranyschopnosťou, u osôb s poruchami imunity a s chronickými ochoreniami, alkoholikov, fajčiarov, alergikov a detí s podvýživou. Výskyt pneumónií je podmienený aj sociálnymi podmienkami a geografickou polohou. Ako je znázornené na Obrázku 2, trpia ňou najviac deti z rozvojových krajín. Letalita pneumónii sa udáva na úrovni 10 - 20 %. Ďalším šírením *S.*

pneumoniae hematogénnou cestou dochádza k invazívnej forme pneumónie, ktorá je život ohrozujúca (Bazovská a kol. 2007, www3).



Obrázok 2 : Na obrázku sú znázornené rozdiely vo výskyte pneumónie u detí vo veku 0 - 5 rokov v krajinách sveta. Výskyt pneumónie prevláda v rozvojových krajinách. Viac ako polovica prípadov pneumónií ročne je sústredená v týchto krajinách: India, Čína, Pakistan, Indonézia, Bangladéš a Nigéria.

Zdroj: wwwA

Šírením baktérie krvným riečiskom dochádza k ťažkým invazívnym pneumokokovým ochoreniam (IPO). Vo viac ako 90 % ide o sepsu, v 5 – 10 % ide o meningitídu a malú časť tvoria artritídy, perikarditídy, peritonitídy a iné (Maďar, 2004; Oleár a kol., 2014; Schindler, 2014).

Výskyt invazívnych pneumokokových ochorení ovplyvňuje 5 základných faktorov:

- vek (nad 50 rokov),
- rasa (vyššia incidencia u afroameričanov),
- socioekonomický status,
- vírusové respiračné nákazy (pneumokokové ochorenia väčšinou ako sekundárne),
- sprievodné chronické ochorenie (kardiovaskulárne ochorenia, cirhóza, diabetes mellitus, renálne zlyhanie, HIV, transplantácia orgánov) (Maďar, 2004).

S. pneumoniae patrí k hlavným pôvodcom **meningitídy**. Ochorenie často vedie k úmrtiu alebo zanechá trvalé následky, napr. paralýza, krče, straty sluchu alebo motorického deficitu. Prognóza ochorenia závisí od rýchlosti určenia diagnózy a správne zvolenej a najmä včas podanej liečby. Aby nedochádzalo k recidívam je dôležité vyhľadanie primárneho ložiska baktérií. Letalita sa pohybuje od 30 % až po 80 % u rizikových osôb (Maďar, 2004; Oleár a kol., 2014).

2.5 Antibiotická rezistencia

S. pneumoniae bol v roku 1881 vyizolovaný a identifikovaný Pasteurom a Sternbergom a v roku 1886 bol potvrdený ako príčina pneumónií. Ďalších 80 rokov bol liekom voľby pri liečbe pneumokokových ochorení penicilín. Pneumokok patril do skupiny mikróbov citlivých na väčšinu antibiotík (ATB), vrátane penicilínu. V roku 1967 nastal prelom – bol prvýkrát izolovaný kmeň *S. pneumoniae* rezistentný na penicilín. Postupne boli izolované kmene pneumokokov rezistentné nie len na antibiotiká penicilínového radu, ale aj na makrolidy, cefalosporíny, tetracyklíny a chloramfenikol. Je to patogén s rýchlo sa šíriacou rezistenciou na antibiotiká s podstatnými geografickými rozdielmi. Slovensko sa zaraďuje medzi krajiny s vyššou incidenciou kmeňov rezistentných na ATB (Hupková a kol., 2007; Maďar, 2004).

Kmene *S. pneumoniae* rezistentné na penicilín sa rozdeľujú podľa stupňa rezistencie do dvoch skupín:

- Intermediálne rezistentné kmene – kmene so zníženou citlivosťou s minimálnou inhibičnou koncentráciou MIC penicilínu do 2,0 mg/l
- Plne rezistentné kmene – kmene s úplnou rezistenciou na penicilín s MIC penicilínu viac ako 2 mg/l

. Liečba ochorení spôsobených kmeňmi so zníženou rezistenciou spočíva v podávaní bežných ATB (penicilín, amoxicilín) vo zvýšených dávkach. Pri ochoreniach spôsobených plne rezistentnými kmeňmi je pravdepodobné zlyhanie ATB terapie. Tieto ochorenia sú v niektorých prípadoch liečené toxickejšími ATB (vankomycín). Ich liečba je komplikovaná a vyžadujú si hospitalizáciu (Hupková a kol., 2007).

2.6 Prevencia

V prevencii pneumokokových ochorení sa uplatňujú všeobecné opatrenia, tak ako aj pri iných ochoreniach respiračného traktu. Špecifickým opatrením proti pneumokokovým ochoreniam je vakcinácia, pričom v súčasnosti sú na Slovensku dostupné 3 typy vakcín: Pneumo 23, Prevenar 13 a Synflorix (Bazovská a kol., 2007; Dluholucký, 2010).

Od roku 2009 je na Slovensku vakcinácia proti invazívnym pneumokokovým ochoreniam zaradená medzi povinné pravidelné očkovania. Toto očkovanie sa podáva v prvom roku života a zahŕňa tri dávky vakcíny (Oleár a kol., 2014).

Zavedenie vakcíny do plošného očkovania prispelo k výraznému poklesu morbidity a mortality detí a starších ľudí. Prispelo to aj k poklesu nosičstva pneumokokov, zníženiu počtu akútnych zápalov stredného ucha a pneumónií. Od 1. júla 2010 sa Slovensku očkujú deti 13-valentnou alebo 10-valentnou vakcínou. 13-valentná konjugovaná pneumokoková vakcína zahŕňa až 90 % sérotypov *S. pneumoniae*, ktoré najčastejšie spôsobujú IPO (Dluholucký, 2010).

3. Genetické vlastnosti *S. pneumoniae*

S. pneumoniae je dôležitý modelový organizmus v oblasti molekulárnej biológie. Pneumokoky zohrávali dôležitú úlohu pri preukazovaní, že genetický materiál sa skladá z DNA. Prvým medzníkom v histórii molekulárnej genetiky bol experiment Fredericka Griffitha v roku 1928. Vďaka kmeňom pneumokokov sa mu podarilo popísať mechanizmus transformácie. V roku 1944 Oswald Avery, Colin MacLeod a Maclyn McCarty nadviazali na Griffithov pokus transformácie. Dokázali, že transformujúci faktor nie je proteín, ale DNA. Averyho dôkaz o transformácii DNA sa označuje ako začiatok éry molekulárnej genetiky (Gasc, a kol. 1991; Griffiths, a kol. 2000; www4).

3.1 Genóm *S. pneumoniae*

Genóm pneumokoka pozostáva z jedného kruhového chromozómu. Jeho dĺžka sa pohybuje v rozmedzí od 2 do 2,2 miliónov bázových párov (www5). Jadro genómu *S. pneumoniae* sa skladá z 1647 kódujúcich sekvencií vrátane paralógov. Zostávajúce kódujúce sekvencie, ktoré nie sú konzervované vo všetkých členoch druhu sú súhrne označované ako príslušenstvo genómu. Obsahujú gény kódujúce proteíny, ktoré nie sú podstatné pre daný druh. Celkový génový súbor (jadro a príslušenstvo genómu) sa nazýva pan-genóm. *S. pneumoniae* sa skladá z otvoreného pan-genómu, čo znamená, že sekvenovanie nových pneumokokových izolátov kontinuálne pridáva nové gény do aktuálneho genofondu (Chaguza a kol., 2015).

3.2 Rekombinácia

S. pneumoniae je vysoko rekombinantná baktéria. Bola použitá ako modelový organizmus pri študovaní a popisovaní rekombinácie. Genetická rekombinácia je proces v ktorom je exogénna DNA začlenená do genómu. Ide o prerušenie a opätovné spojenie molekúl DNA s výmenou ich častí, takže vznikne molekula DNA s vymenenými časťami nukleotidových sekvencií. Ide o kľúčový evolučný mechanizmus, ktorý pneumokok využíva na rýchle prispôsobenie sa selektívnemu tlaku. Rýchlosť, pri ktorej pneumokok získava genetickú variabilitu prostredníctvom rekombinácie je oveľa vyššia, ako rýchlosť, pri ktorej organizmus získava variácie prostredníctvom spontánných mutácií. Táto variabilita umožňuje pneumokokom obísť hostiteľovu imunitnú odpoveď a uniknúť vonkajším vplyvom vrátane antibiotickej terapie. Genetická rekombinácia poháňa adaptáciu a evolúciu *S. pneumoniae*. Laterálny (horizontálny) génový prenos exogénnej

DNA môže viesť k rekombinácii segmentov DNA. Ak rekombinácia zahŕňa vnesenie nových génov DNA hovoríme o heterologickej rekombinácii. Ak baktéria pri rekombinácii mení svoje vlastnosti premiestnením svojich génov ide o homologickú rekombináciu (Chaguza a kol., 2015; Votava, 2005).

3.3 Medzibakteriálna výmena DNA

K výmene genetickej informácie v baktériách dochádza prostredníctvom 3 procesov: konjugáciou, transformáciou alebo transdukciou. U pneumokokov k výmene DNA dochádza prostredníctvom transformácie. Ide o prevzatie časti DNA inej baktérie a včlenenie jej do svojho chromozómu. Prenáša sa iba okolo 10 génov, z ktorejkoľvek náhodnej časti genómu. Pneumokoky získavajú DNA z usmrtených a rozložených baktérií. Transformácia prebieha väčšinou v logaritmickú fázu rastu baktérií. Donorová DNA sa viaže na bunkový povrch. Jedno vlákno je rozložené a druhé je pomocou enzýmu prepravené do bunky. Význam transformácie spočíva v tom, že do baktérie môžu byť vnesené gény kódujúce faktory virulencie alebo transpozóny nesúce gény rezistencie (Chaguza a kol., 2015; Votava, 2005).

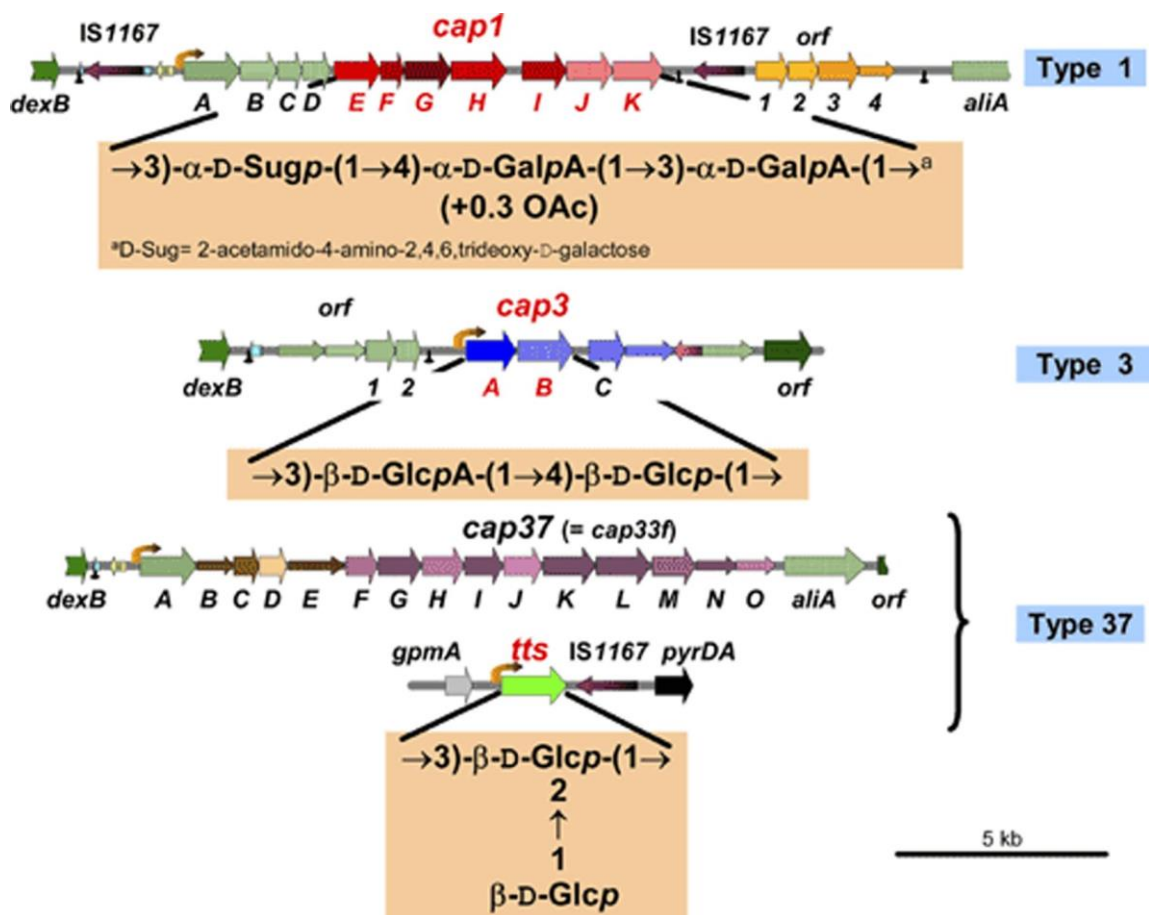
3.4 Genetika sérotypov a séroskupín

Hlavným faktorom virulencie patogénnych baktérií je polysacharidová kapsula, ktorá sa nachádza na povrchu. Podľa typu kapsulárneho polysacharidu poznáme viac ako 90 sérotypov pneumokokov. Na rozdelenie pneumokokov do séroskupín a sérotypov bola zavedená fenotypová typizácia. Sérotypy sa líšia v type a počte génov, ktoré kódujú proteíny zodpovedné za syntézu a export kapsuly. Pre takmer všetky sérotypy je operón kódujúci kapsulu umiestnený medzi génmi nezúčastňujúcimi sa na syntéze puzdra, t.j. *dexB* a *aliA*. Gény *cpsA*, *cpsB*, *cpsC* a *cpsD* sú zodpovedné za reguláciu produkcie puzdra (Andam and Hanage, 2015; Bentley, 2006; Schaffner, 2014).

Puzdrá pneumokokov sú zložené z polysacharidov vylučovaných von z bunky a obklopujúcich povrch baktérií. Gény kódujúce biosyntézu pneumokokového puzdra sú zoskupené v klastroch. *S. pneumoniae* má tri rôzne modely organizácie kapsulárnych génových klastrov.

Najbežnejšia organizácia kapsulárnych génov sa nachádza v sérotypoch 1, 2, 4, 6B, 8, 9V, 14, 18C, 19F, 19A, 19B, 19C, 23F a 33F. Gény *cap/cps* sú umiestnené medzi *dexB* a *aliA*, dvoma génmi, ktoré nemajú úlohu v biosyntéze kapsuly. Promótor sa nachádza bezprostredne pred génovými skupinami. Gény *cpsB*, *cpsC* a *cpsD* sú esenciálne pre

neopuzdrené pneumokoky. Sérotyp 3 je odlišný od statných sérotypov. Má jednoduchú chemickú štruktúru. Obsahuje iba tri kompletne gény, ktoré boli nájdené v kapsulárnom operóne. Sérotyp 3 je odlišný v tom, že na kapsulárnu biosyntézu je potrebný len jeden enzým *cap3B*. Odlišným pneumokokovým sérotypom je aj sérotyp 37. Tento kmeň obsahuje lokus *cap37*, identický s kmeňom sérotypu 33F, ale mutácie inaktivovali niekoľko čítacích rámcov, teda tento lokus je tichý (Rubens Lópe, Ernesto García, 2004; Moscoso, García, 2009). Gény *cps* lokusov sú znázornené na Obrázku 3.



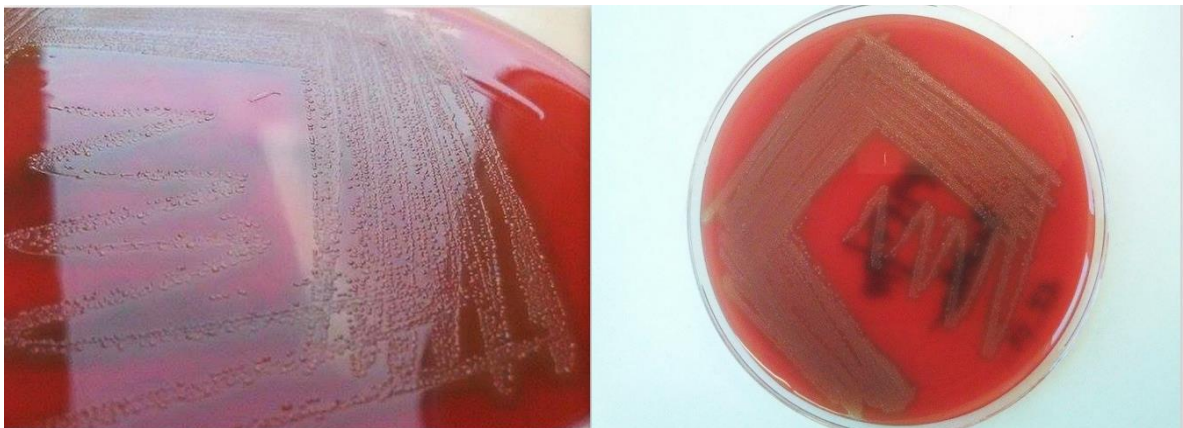
Obrázok 3: Znázornenie génov *S. pneumoniae* troch reprezentatívnych sérotypov.

Zdroj : wwwB

4 Základná diagnostika

4.1 Kultivácia

S. pneumoniae sa kultivuje na vlhkých a obohatených pôdach. Na krvnom agare kultivácia prebieha 24 hod. Kultivuje sa v termostate pri 35 – 37 °C. Rastie fakultatívne anaeróbne, CO₂ podporuje jeho rast. Pre pneumokoky je na krvnom agare typická alfa-hemolýza (zelená zóna viridácie). Kolónie sú približne 1 mm veľké, lesklé, spočiatku vypuklé, niekedy mukózne. Kolónie s preliačeným stredom, typické pre *S. pneumoniae*, vznikajú autolýzou najstarších buniek uprostred kolónie. Typický rast *S. pneumoniae* na krvnom agare je znázornený na Obrázku 4 (Bednár, 1996; Kompaníková a kol., 2013; Votava a kol., 2003; WHO manual, 2011).



Obrázok 4: Na obrázku môžeme vidieť naočkovaný kmeň *S. pneumoniae* na krvnom agare po 24 hodinovej kultivácii v termostate pri 37 °C. V ľavej časti obrázka je znázornený detailný rast kolónií *S. pneumoniae* na krvnom agare, ktoré sú lesklé a vypuklé. V pravej časti obrázka je viditeľná alfa-hemolýza, ktorá sa vytvorila pod kolóniami *S. pneumoniae*.

Zdroj: vlastný obrázok

4.2 Gramovo farbenie a mikroskopia

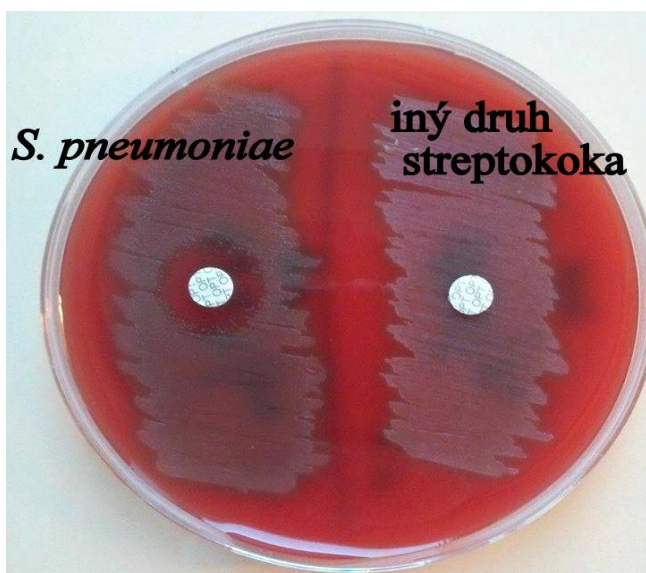
Preparát pripravený z kmeňa *S. pneumoniae* sa zafarbí Gramovým farbením. Pri mikroskopickom vyšetrení sa pneumokoky javia ako grampozitívne diplokoky alebo ako koky pospájané v retiazkach. Pneumokoky môžu mať zmenené morfológické vlastnosti vplyvom antibiotickej liečby a pri mikroskopovaní sa môžu zdať ako gramnegatívne (Votava a kol., 2003; Kompaníková, 2013; WHO manual, 2011).

4.3 Základné diferenciálno-diagnostické testy

Na odlišenie pneumokokov od iných grampozitívnych viridujúcich baktérií sa používajú diferenciálno-diagnostické testy, ako napr. katalázový test, optochínový test a test rozpustnosti v žlči.

Na rýchle diferencovanie grampozitívnych baktérií sa využíva katalázový test. Kataláza je enzým, ktorý štiepi peroxid vodíka na vodu a kyslík. Kyslík uniká a vytvára bublinky v tekutine. *S. pneumoniae* je kataláza-negatívna baktéria (WHO manual, 2011).

Na odlišenie fyziologických alfa-hemolytických streptokokov od *S. pneumoniae* sa používa optochínový test. Optochín je chinínový derivát, ktorého degradačné účinky zapríčínajú selektívnu lýzu pneumokokov. Prevedenie optochínového testu na krvnom agare je znázornené na Obrázku 5 (Kompaníková, 2013; WHO manual, 2011).



Obrázok 5: Dôkaz pneumokoka optochínovým testom na krvnom agare. Na ľavej strane obrázku je prítomná zóna zábrany rastu baktérie. Prítomnosť zóny zábrany rastu testovaného kmeňa na optochín znamená, že ide o *S. pneumoniae*. V prípade, že testovaný kmeň rastie bez zóny zábrany rastu v okolí optochínového disku tak, ako v pravej časti obrázku, nejde o *S. pneumoniae*, ale o iný druh alfa-hemolytického streptokoka.

Zdroj: vlastný obrázok

Ďalším testom na odlišenie *S. pneumoniae* od ostatných alfa-hemolytických streptokokov je test rozpustnosti v žlči. Tento test je založený na zistení, že baktérie *S. pneumoniae* lyzujú pôsobením roztoku deoxycholátu sodného. Ak pôsobením roztoku na kmeň nedochádza k lýze, nejde o pneumokoka (Kompaníková, 2013; WHO manual, 2011).

5 Nadstavbová diagnostika

Sérotypizácia, čiže stanovenie sérotypu daného kmeňa, patrí k nadstavbovej diagnostike. Pre liečbu pneumokokových ochorení nie je nevyhnutná, ale má úlohu pri epidemiologickom sledovaní IPO. Surveillance IPO sa venuje Národné referenčné centrum pre pneumokokové a hemofilové nákazy (NRC) na Regionálnom úrade verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici od roku 2011. Sérotypizácia sa v NRC vykonáva sérologickými a molekulárno-biologickými metódami (Bottková a kol., 2013). Výber metód použitých na sérotypizáciu závisí na úspešnosti kultivácie *S. pneumoniae*. Po úspešnej kultivácii je možné na zistenie sérotypu použiť sérologické metódy ako latexová aglutinácia a quellung reakcia. Pre nadstavbovú diagnostiku pri sérotypizácii je možné použiť molekulárno-biologické metódy. Tie sa využívajú hlavne u kmeňov, ktoré nie je možné vykultivovať.

5.1 Sérologické metódy

Medzi sérologické metódy patrí latexová aglutinácia a quellung reakcia. Sú to pomerne rýchle a nenáročné metódy typizácie (Porter, 2014).

Latexová aglutinácia na nosičoch sa používa na dôkaz antigénu *S. pneumoniae*. Používajú sa komerčne vyrábané súpravy, ktoré obsahujú latexové častice s naviazanými protilátkami proti známym typom streptokokom. Je zameraná na sérotypy preventabilné očkovaním (Bottková a kol., 2013; Votava, 2010).

Quellung reakcia sa považuje za zlatý štandard v sérotypizácii *S. pneumoniae*. Táto metóda je založená na reakcii polysacharidového puzdra pneumokoka so špecifickou protilátkou. Pri pozitívnej reakcii pneumokoka s kapsulárnou protilátkou sa puzdro *S. pneumoniae* stáva viditeľným v mikroskope. Táto zmena sa pozoruje pod mikroskopom s fázovým kontrastom (Bottková a kol., 2013; Werno, Murdoch, 2008).

5.2 Molekulárno-biologické metódy

Molekulárno-biologické metódy patria medzi moderné diagnostické metódy. Rýchly rozvoj týchto metód nastal v priebehu posledných rokov. Poznatky molekulárnej biológie sa čoraz častejšie aplikujú v mikrobiológii. Molekulárne metódy sa využívajú pri identifikácii jednotlivých agens, skúmaní vlastností a evolúcie jednotlivých bakteriálnych druhov a pri mapovaní ich genómov. Aplikovanie molekulárno-biologických metód do laboratórnej praxe klinickej mikrobiológie zefektívňuje surveillance a monitoring ochorení (Klement a kol., 2009; WHO manual, 2011). Jedným z najväčších

objavov v molekulárnej biológii je polymerázová reťazová reakcia – PCR (Polymerase Chain Reaction). Princíp tejto metódy objavil Kary Mullis v roku 1983 a prvá publikácia opisujúca PCR metódu vyšla v roku 1985. V súčasnosti predstavuje základnú metódu pri študovaní genómu, jednotlivých génov, génových mutácií a dedičných ochorení. Od jej objavenia patrí k najpoužívanejším metódam v medicínskom a molekulárno-biologickom výskume. Vyžitie má aj v prenatálnej diagnostike pri detekcii ochorení plodu, vo forenznej medicíne, v potravinárstve pri zisťovaní prítomnosti patogénov, atď. PCR metóda sa čoraz častejšie používa aj v laboratóriách klinickej mikrobiológie. Dokáže identifikovať pôvodcu ochorenia a dokázať jeho prítomnosť, a to z minimálneho množstva rôznych typov biologických materiálov (napr. 200 µl krvi). Pomocou PCR je možná aj identifikácia nekultivovateľných či ťažko kultivovateľných baktérii a vírusov (Klement, 2009; Križanová, 2012).

5.2.1 Polymerázová reťazová reakcia

PCR je *in vitro* diagnostická metóda, pomocou ktorej je možné amplifikovať určitý úsek DNA z minimálneho množstva materiálu (teoreticky z jednej molekuly). Medzi základné zložky PCR reakcie patrí templátová DNA, primery (syntetické oligonukleotidové úseky DNA), deoxynukleotidy, termostabilná DNA polymeráza, tlmivý roztok a ďalšie. Všetky zložky reakcie sú pridávané v malých objemoch. Po PCR amplifikácii je možné analyzovať namnožený materiál, ktorého priama detekcia bez PCR amplifikácie nebola možná (Klement, 2009; Križanová, 2012).

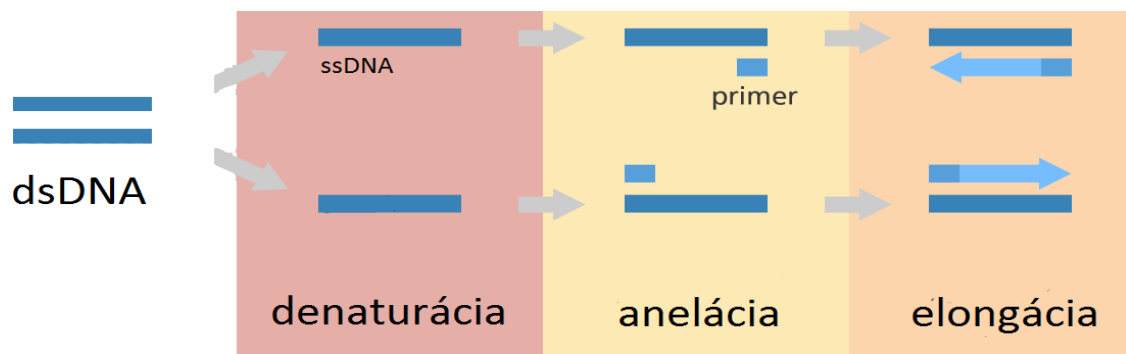
5.2.1.1 Postup PCR

Prvým nevyhnutným krokom je izolovanie nukleovej kyseliny (DNA, prípadne RNA) z vyšetřovaného materiálu. Podľa druhu vyšetřovaného agens sa používa ako templát genómová DNA, ktorú je možné pripraviť priamo, alebo komplementárna cDNA, ktorá sa pripravuje reverznou transkripciou z RNA (Križanová, 2012). Na izoláciu nukleových kyselín existuje niekoľko komerčne vyrobených kitov a postupov. Nukleová kyselina môže byť izolovaná fenol-chloroformovou metódou, kolónkovou metódou (zachytenie NK na pevnej fáze), pomocou magnetických nosičov, atď. (Klement, 2009; Križanová, 2012).

Priebeh samotnej PCR je druhým krokom. Tento krok prebieha v termocykléri, pretože optimálne teploty zohrávajú hlavnú úlohu pri množení DNA vlákna. Podstatou PCR sú tri opakujúce sa kroky, ktoré sú znázornené aj na Obrázku 6.

- Denaturácia dsDNA - teplotou 94 – 97 °C sa dsDNA denaturuje, teda sa rozpletie na dve vlákna ssDNA.
- Anelácia primerov – pri teplote 55 – 68 °C prebieha anelácia (nasadnutie) primerov. Na vlákna ssDNA sa komplementárne hybridizujú primery.
- Elongácia – pri teplote 68 – 72 °C sa aktivuje DNA polymeráza, ktorá pridáva nukleotidy do novovznikajúceho reťazca na základe komplementarity. DNA polymeráza syntetizuje vlákna od primerov.

V každom cykle sa počet DNA zdvojuje. Počet cyklov sa pohybuje v rozmedzí 25 - 35. Optimálny počet závisí na východiskovej koncentrácii templátu a od koncentrácie jednotlivých zložiek PCR. Nedostatočný počet cyklov môže zapríčiniť nedostatočné množstvo produktu amplifikácie a nadmerný počet cyklov tvorbu nešpecifických produktov. Kontrola kvality sa vykonáva na základe pozitívnej a negatívnej kontroly (Klement, 2009; Križanová, 2012).



Obrázok 6: Priebeh PCR schematický znázornený v troch cyklických krokoch. Na obrázku je znázornená dsDNA, ktorá sa v prvom kroku denaturuje na dve ssDNA. Následne je znázornené nasadenie primerov na vlákna DNA. V poslednom kroku vidíme predlžovanie nového komplementárneho vlákna DNA v smere šípky.

Zdroj: spracované podľa wwwC

Posledným krokom je detekcia a vyhodnotenie vzniknutého produktu PCR. Na detekciu vzniknutých produktov sa využíva elektroforéza v agarózovom géli. Elektroforéza prebieha v tlmivom roztoku. Delenie nukleových kyselín v géli prebieha na základe veľkosti molekúl. Na zviditeľnenie molekúl sa používajú rôzne činidlá, napr. etidium bromid. Molekuly sú po prebehnutí elektroforézy viditeľné po osvetení UV svetlom. Vzniknuté PCR produkty sú vyhodnocované na základe prirovnania k veľkostnému markeru (Klement, 2009; Križanová, 2012).

5.2.2 Multiplexná PCR

Multiplexná PCR sa zaradzuje medzi molekulárno-biologické metódy. Je jednou z modifikácií PCR, no umožňuje zistiť prítomnosť viacerých génov vo vyšetrovanom materiáli súčasne. Závisí to od počtu pridaných primerov do reakcie. Je to moderná metóda, ktorá sa využíva aj na sérotypizáciu *S. pneumoniae*. Oproti sérologickým metódam má mnoho výhod, napr. možnosť využitia metódy u nekultivovateľných kmeňoch, pri malom množstve biologického materiálu alebo prípadne určenie sérotypu priamo z neho (Bottková a kol., 2013; Klement, 2009).

5.2.2.1 Multiplexná PCR využívaná v NRC

Na sérotypizáciu pneumokokov sa v NRC pre pneumokokové a hemofilové nákazy používa sled multiplexných PCR. Sú používané dva typy multiplexných reakcií nasledujúcich po sebe. Prvou je skupinová reakcia, v ktorej sú testované vzorky zaradené do jednej zo šiestich skupín. Súvisiace sérotypy sú zaradené do skupín na základe amplifikácie spoločných génov. Na základe údajov získaných z prvej reakcie a zaradením pneumokoka do jednej zo šiestich skupín, nasleduje druhá reakcia, nazývaná aj špecifická reakcia. Tu sú už pridávané primery špecifické pre určité sérotypy v rámci jednej skupiny (Brito a kol., 2003). Zavedenie tejto metódy umožnilo komplexnejšiu diagnostiku sérotypov pneumokokov. Vďaka nej je možné určiť sérotyp *S. pneumoniae* aj v už vyššie spomínaných kmeňoch, ktoré nie je možné opätovne vykultivovať. Týmto bol zdokonalený systém sérotypizácie a zároveň surveillance, keďže je možné zistiť sérotyp už v skoro všetkých vzorkách zaslaných do NRC (Bottková a kol., 2013).

5.2.3 Nové molekulárno-biologické metódy

V súčasnosti je vo svete vyvinutých a používaných na sérotypizáciu niekoľko ďalších molekulárno-biologických metód. V NRC sa nevyužívajú kvôli finančnej a prístrojovej náročnosti. Na sérotypizáciu v NRC sú vyššie popísané metódy dostačujúce, no v prípade potreby je možné previesť genotypizačnú metódu PFGE.

5.2.3.1 Multilocus Sequence Typing analysis (MLST)

MLST je molekulárna typizačná metóda založená na sekvenovaní siedmich housekeepingových génov. Princíp MLST je založený na identifikovaní vnútorných nukleotidových sekvencií veľkosti približne 400 až 500 bp v rôznych housekeepingových génoch. Unikátnym sekvenciám, alelám, sú priradené čísla. Kombinácia alel v lokuse sa

označuje ako alelický profil. Diagnostikované kmene sú identifikované na základe ich alelických profilov určených z nukleotidových sekvencií. MLST je metóda časovo a finančne náročná. Začína PCR amplifikáciou s použitím špecifických primerov a nasledovným sekvenovaním. Posledným krokom je vyhodnotenie pomocou softvéru. Ľahko prístupná je verejná databáza PubMLST, ktorá zbiera dáta zo všetkých databáz. MLST je v anglickej literatúre popisovaná ako konvenčná a bežne využívaná metóda v molekulárno-biologických a mikrobiologických laboratóriách na sérotypizáciu *S. pneumoniae*, avšak na Slovensku sa na sérotypizáciu doposiaľ nevyužíva (Larsen a kol., 2012; www6; WHO manual, 2012).

5.2.3.2 Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA)

Metóda MLVA je využívaná na molekulárnu typizáciu mikroorganizmov. Je založená na sekvenovaní tandemových opakujúcich sa DNA sekvencií, ktoré sa nachádzajú v rôznych lokusoch v génome baktérie. Táto metóda vychádza z metódy DNA fingerprintu, kde sú sekvenované gény ľudského pôvodu. MLVA je metóda používaná na posúdenie DNA fingerprintu u baktérií. Pri sérotypizácii pneumokokov je táto metóda využívaná iba ako alternatívna pri neschopnosti použiť inú, menej náročnú metódu (Costa, 2016; www7).

5.2.3.3 Whole Genome Sequencing (WGS)

WGS je metóda, pomocou ktorej je možné úplne sekvenovanie génomu mikroorganizmov. Získanie sekvencie celého génomu baktérie je náročný proces, no objasňuje genetické a fyziologické vlastnosti baktérií. Po získaní bakteriálneho génomu WGS softvér porovnáva zostavené sekvencie príbuzných kmeňov alebo bez referenčného kmeňa vyhodnocuje sekvencie samotného kmeňa *de novo*. U viac ako 3000 baktérií je osekvenovaný a popísaný celý génom a ročne je popísaných viac ako 500 nových druhov (Punina, a kol., 2015; www8).

5.2.3.4 Pulsed-Field Gel Electrophoresis typing (PFGE)

Pulzná gélová elektroforéza (PFGE) je metóda molekulárnej typizácie používaná na získanie DNA fingerprintu izolovaných baktérií. Je založená na vytvorení genetickej mapy, na základe ktorej je možné odlíšiť jednotlivé kmene a druhy. Bakteriálny izolát sa pripravuje prekrytím baktérií agarózou, následne sa bakteriálna bunka otvorí a uvoľní sa z nej DNA. Akonáhle je DNA uvoľnená a imobilizovaná v agaróze, nasleduje štiepenie

reštrikčnými enzýmami v špecifických (reštrikčných) miestach. Získaná zmes DNA fragmentov sa potom nanesie na agarózový gél, kde sa pod vplyvom elektrického poľa delí na základe veľkosti. Na rozdiel od klasickej elektroforézy sa pri pulznej mení polarita elektrického prúdu. Elektrické pole sa mení v troch smeroch. Týmto spôsobom sa vytvorí DNA fingerprint, ktorý je potom porovnávaný a vyhodnocovaný softvérom. Porovnávaním fingerprintov baktérií je možné skúmať genetické súvislosti. Týmto spôsobom sa dajú porovnávať aj baktérie *S. pneumoniae* (www9; www10).

6 Materiál a metódy

6.1 Materiál

6.1.1 Testovaný súbor

Testovaný bol súbor 10 vzoriek DNA, ktoré pochádzali z kmeňov *S. pneumoniae* zaslaných do NRC v rokoch 2013 a 2014. Sérotypy pneumokokov boli stanovené sérologickými metódami – latexovou aglutináciou a quellung reakciou.

Izolovaná DNA je uskladňovaná v hlbokomraziacom boxe pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mikroskúmavkách typu Eppendorf označených laboratórnym evidenčným číslom a dátumom izolácie.

6.1.2 Materiál potrebný na skupinovú a špecifickú mPCR

Tabuľka 1: Roztoky a chemikálie potrebné na skupinovú a špecifickú mPCR. Použité primery závisia na type mPCR. Voda sa dopĺňa do konečného objemu reakcie, čo predstavuje 25 μl .

Roztoky a chemikálie	Zásobná koncentrácia
QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit	
Reaction Mix	2x
Coral loading dye	10x
Ultračistá voda	-
Primery (viď. Tabuľka 3 a Tabuľka 6)	-

Všetky PCR reakcie prebiehali v termocykléri C1000 Touch firmy BioRad.

6.1.3 Materiál potrebný na gélovú agarózovú elektroforézu

Tabuľka 2: Roztoky a chemikálie potrebné na gélovú agarózovú elektroforézu

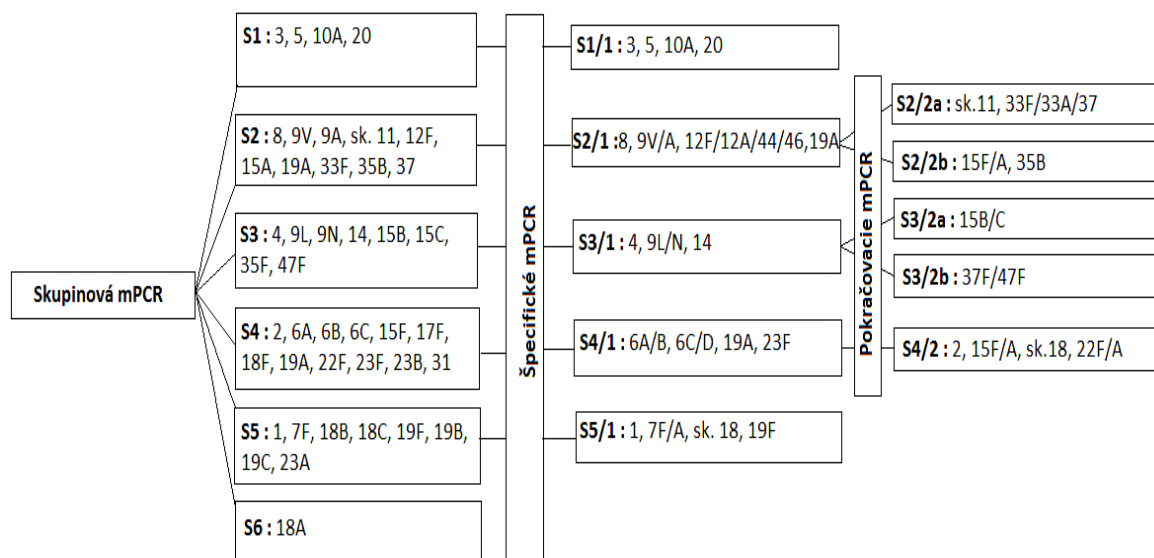
Roztoky a chemikálie	Pracovná koncentrácia
Agarose Molecular Biology Grade, range 50bp-50kbp (Bioron)	1,5%
Etidiumbromin (AppliChem)	12 ng/ml
GeneRuler 100bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas)	1,2 - 1,5 ng
TBE - tris-borátový tlmivý roztok (AppliChem)	1x koncentrovaný

Gélová elektroforéza prebiehala v elektroforetickej aparatúre Bio Rad Wide Mini – Sub Cell GT, napojenej na zdroj napätia PowerPac Basic BioRad. Na vyhodnotenie a vytvorenie fotodokumentácie bol použitý transiluminátor Bio Rad Universal hood II so softvérom Quantity One.

6.2 Metódy

Na určenie sérotypu sme použili systém po sebe nasledujúcich multiplexných PCR, ktorý je znázornený na Obrázku 7. Tento systém sa využíva v NRC na sérotypizáciu *S. pneumoniae* u kmeňov, u ktorých nie je možná typizácia latexovou aglutináciou a quellung reakciou. Vo vybraných 10 vzorkách sme stanovovali sérotyp týmto systémom PCR.

Systém po sebe nasledujúcich PCR pozostáva z niekoľkých mPCR. Prvá sa nazýva skupinová. V nej je daná vzorka zaradená do jednej zo šiestich skupín. Druhá reakcia je špecifická. Na základe špecifických primerov je možné zistiť o akého sérotypu alebo séroskupiny je pneumokok vo vyšetrovanej vzorke.



Obrázok 7: Znázornenie sledu po sebe nasledujúcich mPCR a rozdelenie jednotlivých sérotypov do séroskupín.

Zdroj: Vlastný obrázok (Spracované podľa – Bottková, 2013)

6.2.1 Skupinová multiplexná PCR

Skupinovú mPCR sme robili pomocou komerčne vyrobeného kitu QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit. Z kitu sme použili mastermix, Coral loading dye a ultračistú vodu. Tieto zložky reakcie sme pridali v objemoch podľa Tabuľky 1. Do reakcie sme napipetovali primery pre skupinovú mPCR podľa Tabuľky 3. Koncentrácia všetkých primerov bola 0,5 $\mu\text{mol/l}$, okrem primeru cpsB-for, ktorého koncentrácia bola 1 $\mu\text{mol/l}$. Objem reakcie bol 25 μl . Vzorku v objeme 5 μl sme pridali ako poslednú. Následne sme vzorky vložili do termocykléra a zvolili program pre skupinovú reakciu, ktorý je popísaný v Tabuľke 4.

Tabuľka 3: Rozpis primerov pre skupinovú mPCR

Forward primer	Reverse primer	Veľkosti PCR produktov (bázové páry)
cpsB-for	cpsC-rev1	1187 bp
	cpsC-rev2	980 bp
19FcpsO-for	19FcpsO-rev	814 bp
Primer pre internú kontrolu - for	Primer pre internú kontrolu - rev	657 bp

Tabuľka 4: Program pre skupinovú mPCR (spracované podľa - Bottková, 2013)

	Teplota	Čas	Počet cyklov
Aktivácia polymerázy	95 °C	5 min.	1
Denaturácia	95 °C	40 s.	30
Anelácia	60 °C	40 s.	
Polymerizácia	72 °C	60 s.	
Záverečná polymerizácia	72 °C	5 min.	1
Chladenie	4 °C	-	1

Po detekcii vzniknutých PCR produktov sme vzorky zaradili do jednej zo šiestich skupín. Schéma podľa ktorej sme vzorky zaradili do skupiny je spracovaná v Tabuľke 5.

Tabuľka 5: Schéma podľa ktorej prebieha zaradenie vzorky do skupiny podľa veľkosti produktov PCR.

Skupina	Veľkosti PCR produktov (bázové páry)
S1	657 bp
S2	657 bp + 1187 bp
S3	657 bp + 980 bp
S4	657 bp + 814 bp + 1187 bp
S5	657 bp + 814 bp + 980 bp
S6	657 bp + 814 bp

6.2.2 Špecifické multiplexné PCR - základné a pokračovacie

Po zaradení vzoriek do jednej zo šiestich skupín sme pokračovali špecifickou mPCR. Špecifickú základnú a pokračovaciú mPCR sme robili pomocou komerčne vyrobeného kitu QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit, z ktorého sme použili mastermix, Coral loading dye a ultračistú vodu. Tieto zložky reakcie sme pridali podľa Tabuľky 1. Primery sme napipetovali podľa toho, do akej skupiny boli zaradené skupinovú mPCR. Rozpis primerov podľa skupín sa nachádza v Tabuľke 6. Rozpis pridávaných primerov pre pokračovaciú mPCR sa nachádza v Tabuľke 7. Do každej reakcie sme pridali kontrolný pár primerov podľa Tabuľky 6. Koncentrácia všetkých primerov bola 0,5 $\mu\text{mol/l}$, okrem primeru pre internú kontrolu, ktorého koncentrácia v reakcii bola 0,2 $\mu\text{mol/l}$. Objem reakcie bol 25 μl . Vzorku v objeme 5 μl sme pridali ako poslednú. Následne sme vzorky vložili do termocykléra a zvolili program pre špecifickú reakciu.

Tabuľka 6: Rozpis pridávania primerov podľa skupín a veľkosti PCR produktov vzniknuté pridaním špecifických primerov v základných špecifických mPCR.

Skupina	Primer	Veľkosti produktov (bázové páry)
S1	3	818
	5	362
	10A	628
	20	514

S2	8	294
	9V/9A	816
	12F/12A/44/46	376
	19A	566

S3	4	430
	9L/9N	516
	14	189
	Primer pre internú kontrolu pre skupinu S3	101

S4	séroskopina 6	250
	6C/6D	727
	19A	566
	23F	384

S5	1	280
	7F/7A	826
	séroskopina 18	573
	19F	408

Primer pre internú kontrolu 160	160
---------------------------------	-----

Primer pre internú kontrolu, ktorého veľkosť PCR produktu je 160 bp, sa pridáva do každej špecifickej reakcie okrem skupiny S3. V tejto skupine sa pridáva primer pre internú kontrolu, ktorého veľkosť PCR produktu je 101 bp. Dôvodom je, že produkt internej kontroly o veľkosti 160 bp by nemusel byť dostatočne odlišný od produktu sérotypu 14 o veľkosti 189 bp.

Tabuľka 7: Rozpis pridávania primerov a veľkosti PCR produktov vzniknuté pridaním primerov v pokračovacích špecifických reakciách mPCR.

Skupina	Primer	Veľkosti produktov (bázové páry)
S2/2a	15F/15A	434
	35B	677
S2/2b	11A/11D	463
	33F/33A/37	388
S3/2a	15B/15C	496
S3/2b	35F/47F	517
S4/2	2	290
	15F/15A	434
	séroskopina 18	573
	22F/22A	643
Primer pre internú kontrolu 160		160

6.2.3 Agarózová gélová elektroforéza

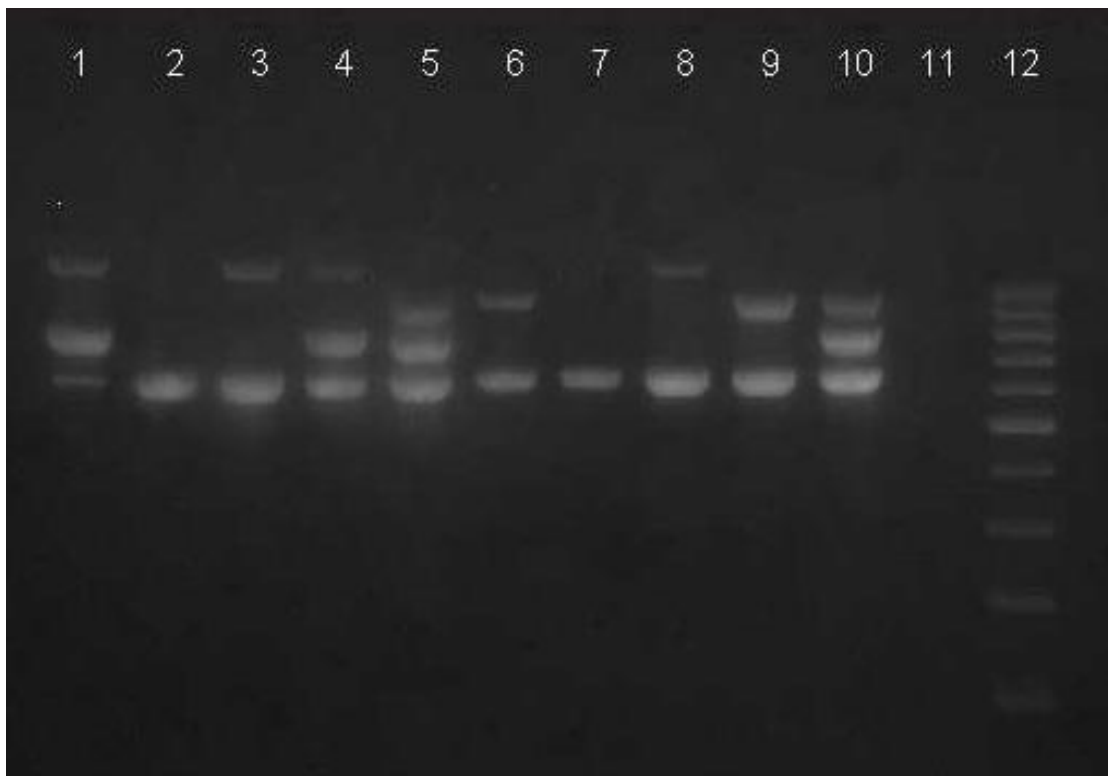
Na detekciu vzniknutých PCR produktov sme použili gélovú elektroforézu. Pripravili sme si 1,5% agarózový gél z agarózy a tlmivého roztoku TBE. Agarózu a TBE sme zhomogenizovali varom. Po ochladení roztoku sme pridali etidiumbromid a po premiešaní sme pripravený roztok vliali do nádoby, kde zatuhol. Pripravený gél sme vložili do elektroforetickej aparatury a zaliali sme ho tlmivým roztokom. Následne sme do jamiek v géli napipetovali vzorky, negatívnu kontrolu a veľkostný marker. Aparatúru sme pripojili ku zdroju napätia. Po prebehnutí elektroforézy (približne 1,5 – 2 hod.) sme gél vybrali a položili do transiluminátora, ktorý gél podsvietil UV svetlom. Pomocou počítača so softvérom Quantity One napojeného na transiluminátor sme vyhotovili fotografie gélu nasvieteného UV svetlom. Fotografie sme si uložili a následne sme z nich odčítali výsledky.

7 Výsledky

Cieľom práce bolo určiť sérotyp 10 izolátov DNA baktérie *S. pneumoniae* pomocou molekulárno-biologických metód a porovnať ho s pôvodným stanovením vykonaným pomocou sérologických metód. Na určenie sme použili systém po sebe nasledujúcich multiplexných PCR. Výsledky sme odčítavali na základe veľkosti vzniknutých PCR produktov, ktoré sme detegovali pomocou elektroforézy.

7.1 Výsledky skupinovej mPCR

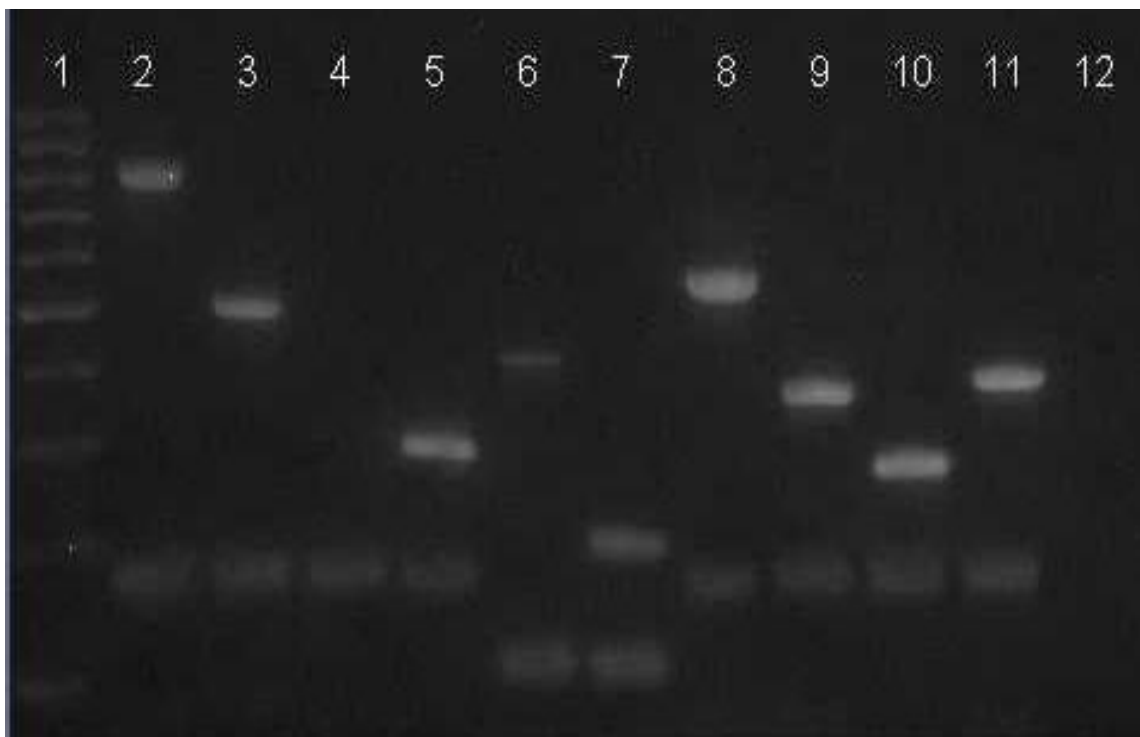
Pomocou skupinovej mPCR sme zaradili vzorky do jednej zo šiestich skupín S1-S6. Každá skupina je definovaná inou kombináciou génov, ktorú detegujeme pomocou mPCR. Na základe kombinácie vzniknutých PCR produktov, a teda aj bandov na géli vyhodnocujeme skupinovú mPCR. Presné veľkosti produktov v jednotlivých skupinách sú popísané v Tabuľke 5. Produkt veľkosti 657 bp slúži ako interná kontrola priebehu reakcie. Výsledok skupinovej mPCR je znázornený na Obrázku 8.



Obrázok 8: Výsledok skupinovej mPCR. Dráha č.1 – skupina S4, dráha č.2 – skupina S1, dráha č.3 – skupina S2, dráha č.4 – skupina S4, dráha č.5 – skupina S5, dráha č.6 – skupina S3, dráha č.7 – skupina S1, dráha č.8 – skupina S2, dráha č.9 – skupina S3, dráha č.10 – skupina S5, dráha č.11 – negatívna kontrola, dráha č.12 – 100-1000 bp veľkostný marker.

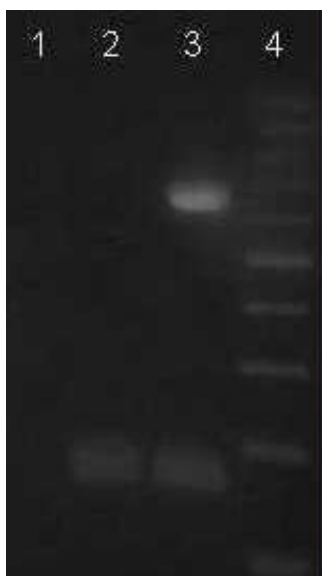
7.2 Výsledky špecifických mPCR

Po zaradení vzoriek do skupín nasledovala špecifická mPCR. Pomocou špecifických primerov sme určovali konkrétne sérotypy alebo kombinácie sérotypov. Primery sme pridávali podľa zaradenia vzorky do skupiny. Rozpis primerov sa nachádza v Tabuľke 6. Okrem týchto primerov sa pridáva interná kontrola o veľkosti 160 bp (S1, S2, S4, S5, S6) alebo 101 bp (S3). Výsledok základnej špecifickej mPCR je na Obrázku 9.



Obrázok 9: Výsledok základnej špecifickej mPCR. Dráha č.1 - 100-1000 bp veľkostný marker, dráha č.2 – DNA sérotypu 3 (818 bp), dráha č.3 – DNA sérotypu 20 (514 bp), dráha č.4 – žiaden PCR produkt okrem kontrolného, dráha č.5 – DNA sérotypu 8 (294 bp), dráha č.6 – DNA sérotypu 4 (430 bp), dráha č.7 – DNA sérotypu 14 (189 bp), dráha č.8 – DNA sérotypu 19A (566 bp), dráha č.9 – DNA sérotypu 23F (384 bp), dráha č.10 – DNA sérotypu 1 (280 bp), dráha č. 11 – DNA sérotypu 19F (408 bp), dráha č.12 – negatívna kontrola.

Po prevedení základnej špecifickej mPCR vo vzorke č.3 nebol detegovaný PCR produkt špecifický pre gény, a tým aj sérotypy, ktoré táto PCR zachytáva. Kvôli tejto vzorke sme previedli pokračovaciu mPCR S2/2a a S2/2b. Primery, ktoré sme použili sú rozpísané v Tabuľke 7. Okrem týchto primerov sa do každej reakcie pridáva primer pre internú kontrolu. Výsledok pokračovacej špecifickej mPCR je znázornený na Obrázku 10.



Obrázok 10: Výsledok pokračovacej mPCR. Dráha č.1 – negatívna kontrola, dráha č.2 – S2/2b - žiaden PCR produkt okrem kontrolného (160 bp), dráha č.3 – S2/2s - DNA sérotypu 35B (677 bp), dráha č.4 – veľkostný marker.

Tabuľka 8 sumarizuje výsledky pôvodného stanovenia sérotypu pomocou sérologických metód (latexovej aglutinácie a quellung reakcie) a opakovaného stanovenia sérotypu pomocou multiplexnej PCR. Zároveň je v nej zahrnutý výsledok skupinovej mPCR všetkých vzoriek.

Tabuľka 8: Výsledky sérotypizácie multiplexnou PCR v porovnaní s pôvodným stanovením vykonaným v NRC.

Číslo vzorky	Číslo v NRC	Pôvodné stanovenie sérotypu	Výsledok skupinovej mPCR	Opakované stanovenie sérotypu	Zhoda výsledkov stanovení
1	44/2013	19A	S4	19A	áno
2	379/2013	3	S1	3	áno
3	466/2013	35B	S2	35B	áno
4	562/2013	23F	S4	23F	áno
5	734/2013	1	S5	1	áno
6	1094/2013	4	S3	4	áno
7	1202/2013	20	S1	20	áno
8	1898/2013	8	S2	8	áno
9	17/2014	14	S3	14	áno
10	334/2014	19F	S5	19F	áno

8 Diskusia

Pneumokokové ochorenia predstavujú závažný zdravotnícky problém. Patria medzi hlavné príčiny morbidity a mortality detí v rozvojových krajinách. Najčastejšie sa vyskytujú u detí do 2 rokov a dospelých nad 55 rokov (Maďar, 2004). Prameňom nákazy sú nosiči a chorí jedinci. K prenosu dochádza kvapôčkovou infekciou hlavne v kolektívoch, ako napr. škôlka, domov dôchodcov. Podľa priebehu sa pneumokokové ochorenia delia na invazívne a neinvazívne. Ochorenia sú preventabilné očkovaním, na Slovensku je zavedené povinné plošné očkovanie.

Pôvodcom pneumokokových ochorení je baktéria *Streptococcus pneumoniae* (pneumokok). Objavená bola Louisom Pasteurom v roku 1881 a nazvaná *Micrococcus*, neskôr *Diplococcus*, a až v roku 1974 bola na základe svojich vlastností zaradená do rodu *Streptococcus* (Beran, 2008). Pneumokoky sa mikroskopickým obrazom javia ako grampozitívne diplokoky veľkosti 0,5 – 1,25 µm. Dvojice obklopuje puzdro, ktoré je hlavným faktorom virulencie. Na základe stavby polysacharidového puzdra rozlišujeme viac ako 90 sérotypov pneumokokov.

Sledovanie sérotypov pneumokokov je nevyhnutné pre optimalizáciu zloženia vakcín (Bazovská a kol., 2007). Geografická poloha a sociálno-ekonomické podmienky ovplyvňujú výskyt jednotlivých sérotypov. Surveillance sérotypov na Slovensku vykonáva Národné referenčné centrum pre pneumokokové a hemofilové nákazy na Regionálnom úrade verejného zdravotníctva v Banskej Bystrici. Údaje NRC prispievajú k hodnoteniu účinnosti povinnej vakcinácie na Slovensku (Bottková a kol., 2013).

Základná laboratórna diagnostika sa opiera o kultiváciu, mikroskopiю a špeciálne testy, ako napr. optochínový test alebo test rozpustnosti v žľi. Nadstavbová diagnostika spočíva hlavne v stanovení sérotypu. Laboratórium NRC vykonáva nadstavbovú diagnostiku kmeňov *S. pneumoniae* sérologickými a molekulárno-biologickými metódami. Sérologickými metódami sérotypizácie sú latexová aglutinácia a quellung reakcia, molekulárno-biologickou metódou je multiplexná PCR.

Cieľom bakalárskej práce bolo zhodnotiť využitie molekulárno-biologických metód využívaných pri sérotypizácii pneumokokových ochorení, ktoré sú dostupné v rámci NRC a porovnať ich. Na základe toho sme zvolili opakované stanovenie sérotypu pomocou multiplexnej PCR u 10 vybraných vzoriek. Pôvodné stanovenie sérotypu bolo prevedené sérologickými metódami (latexová aglutinácia a quellung reakcie). Vzorky pochádzali zo zbierky DNA izolovaných z kmeňov *S. pneumoniae*, ktoré spôsobili IPO. Tieto izolované

DNA sú dlhodobo uskladňované v hlbokomraziacom boxe pri -80 °C. Takýto systém skladovania izolovaných DNA je úsporný a účelný. Veľkou výhodou je možnosť uskladnenia veľkého počtu izolovaných DNA, keďže ide o malý objem uložený v mikroskúmavke. V práci sme použili vzorky izolované z kmeňov pneumokokov v rokoch 2013 a 2014, a aj napriek dlhodobému uskladneniu sa nám podarilo úspešne určiť sérotyp všetkých vzoriek. Na základe našich výsledkov môžeme povedať, že tento systém skladovania v hlbokomraziacom boxe pri -80 °C je vhodný na dlhodobé uskladňovanie izolovanej DNA *S. pneumoniae*. Dlhodobé uchovávanie DNA je vhodné v prípade potreby ďalších analýz v budúcnosti. Ďalšou výhodou je, že izolovaná DNA je hneď po rozmrazení pripravená na použitie. Vďaka tomu je možné rýchle opätovné bezkultivačné stanovenie sérotypu tak, ako to bolo v našom prípade.

Na sérotypizáciu pomocou molekulárno-biologických metód sme zvolili sled multiplexných PCR. Sú to dva typy mPCR reakcií nasledujúcich po sebe. Ako prvú sme previedli skupinovú reakciu. Prevedenie reakcie bolo pomerne rýchle a jednoduché. Na zviditeľnenie vzniknutých PCR produktov sme použili gélovú elektroforézu. Vzorky sme po prebehnutí elektroforézy zaradili do jednej zo šiestich skupín (S1 – S6) na základe amplifikácie spoločných génov resp. veľkosti vzniknutých PCR produktov. Každá skupina zahŕňa niekoľko sérotypov. Prevedením skupinovej reakcie sme pre každú vzorku zúžili škálu sérotypov, ktoré pripadali v úvahu. Ako druhá nasledovala špecifická reakcia. Prevedením tejto reakcie sme pátrali po konkrétnych sérotypoch vyčlenených v rámci skupinovej reakcie. Špecifická reakcia prebiehala podobne ako skupinová, prevedenie bolo taktiež jednoduché. Rozdiel bol v použitých primeroch a programe termocykléra. Touto reakciou sme určili sérotypy vzoriek taktiež na základe veľkosti PCR produktov. Špecifickou mPCR reakciou sme určili sérotyp všetkých vzoriek okrem vzorky č.3, kvôli ktorej sme museli previesť pokračovaciú špecifickú reakciu, ktorou sme úspešne určili sérotyp aj u tejto vzorky. Pomocou vykonania sledu multiplexných PCR sa nám podarilo úspešne stanoviť sérotypy vybraných vzoriek. Výsledky sme porovnali s pôvodným stanovením sérotypu vykonaným sérologickými metódami. Pri všetkých vzorkách sa sérotypy určené našim opakovaným stanovením vykonaným pomocou multiplexnej PCR zhodovali s pôvodným stanovením sérotypu vykonaným latexovou aglutináciou a quellung reakciou.

Multiplexná PCR je pomerne nová metóda v oblasti sérotypizácie pneumokokov. Umožňuje identifikáciu viacerých cieľových DNA sekvencií v rámci jednej PCR, čo

predstavuje výhodu v znížení nákladov na sérotypizáciu. Zavedenie tejto metódy umožnilo komplexnejšiu sérotypizáciu *S. pneumoniae* (Brito a kol., 2003).

Hodnotenie výsledkov sérologických metód môže byť v niektorých prípadoch náročné, subjektívne a čiastočne závisí aj na skúsenostiach pracovníka, ktorý výsledky reakcie odčítava. Hodnotenie výsledkov sérotypizácie mPCR je objektívnejšie. Na základe toho sa táto metóda javí presná a spoľahlivá. Ďalšou výhodou multiplexnej PCR je rýchlosť a nenáročnosť prevedenia. Môžeme skonštatovať, že multiplexná PCR je efektívna metóda sérotypizácie pneumokokov.

PCR je bezkultivačná metóda, materiál potrebný na prevedenie reakcie je izolovaná DNA. Stanovenie sérotypu multiplexnou PCR je možné aj u kmeňov, ktoré nie je možné po prijatí opätovne vykultivovať, čo pomocou sérologických metód nie je možné. Nevýhodou je škála rozsahu, ktorá je obmedzená primermi, no pre sérotypizáciu vzoriek IPO z je obvykle dostačujúca.

Okrem multiplexnej PCR sa na nadstavbovú diagnostiku vo svete využívajú molekulárno-biologické genotypizačné metódy ako napr. MLST (Multilocus Sequence Typing analysis), MLVA (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis), WGS (Whole genome sequencing), a iné. Na Slovensku nie sú dostupné hlavne kvôli finančnej náročnosti. Okrem toho sú aj technologicky náročné, čo sa týka prístrojového vybavenia a taktiež prevedenia. Sú založené na sekvenovaní určitých génov, ako napr. metóda MLST a MLVA, alebo celého genómu, ako napr. WGS. Tieto molekulárno-biologické genotypizačné metódy sú komplexnejšie a dokážu poskytnúť viac informácií o danom izoláte. Okrem toho sú tieto metódy vhodné aj na porovnávanie jednotlivých kmeňov *S. pneumoniae*.

Z molekulárno-biologických genotypizačných metód je v NRC dostupná pulzná gélová elektroforéza (PFGE). Je založená na vytváraní genetickej mapy, na základe ktorej sa zisťuje príbuznosť alebo resp. odlišnosť kmeňov *S. pneumoniae*. Do diagnostiky bola zavedená v súvislosti s povinným očkovaním proti pneumokokovým ochoreniam.

Najvýhodnejšie pre laboratória zamerané na sérotypizáciu pneumokokov je využívanie sérologických aj molekulárno-biologických metód. Využívanie oboch typov metód v NCR prispieva k zdokonaleniu systému surveillance, umožňuje stanoviť širšiu škálu sérotypov a okrem toho predstavuje aj finančnú výhodu.

9 Záver

V bakalárskej práci sme sa venovali baktérii *S. pneumoniae*. V laboratóriu NRC sme úspešne stanovili sérotyp 10 vzoriek uskladnených DNA, ktoré pochádzali zo vzoriek kmeňov pneumokokov izolovaných z IPO. Na sérotypizáciu sme použili systém po sebe nasledujúcich multiplexných PCR. Vybrali sme vzorky, ktoré boli prijaté do NRC v rokoch 2013 a 2014. Sérotypizácia týchto vzoriek bola v čase ich pôvodného stanovenia sérotypu vykonaná sérologickými metódami, čo nám umožnilo porovnať výsledky so sérotypizáciou molekulárno-biologickými metódami.

V diagnostike invazívnych pneumokokových ochorení majú molekulárno-biologické metódy veľký význam. V laboratóriu NRC sme z týchto metód využili PCR (polymerázová reťazová reakcia). Je to moderná diagnostická metóda, ktorá je založená na špecifickom dôkaze DNA.

Multiplexná PCR je jednou z modifikácií PCR. Možnosť detegovať viac cieľových DNA sekvencií v rámci jednej mPCR umožňuje rýchlu, spoľahlivú a finančne efektívnu sérotypizáciu baktérií *S. pneumoniae*. Výhodou tejto metódy oproti sérologickým metódam je možnosť dôkazu pneumokoka a stanovenia sérotypu v nekultivovateľných vzorkách alebo priamo z biologického materiálu. Bez kultivačný dôkaz pomocou mPCR je veľkou výhodou hlavne v diagnostike invazívnych pneumokokových ochorení. Nevýhodou tejto metódy je obmedzená škála jej rozsahu, no pre sérotypizáciu vzoriek IPO je obvykle dostačujúca.

Zlatým štandardom v sérotypizácii pneumokokov sa považuje quellung reakcia, no modernejšia metóda mPCR sa javí ako komplexnejšia a výhodnejšia. V súčasnosti sa na sérotypizáciu v NRC sa využívajú obidva typy metód – sérologické aj molekulárno-biologické.

10 Zoznam použitej literatúry

- ANDAM, C. P. - HANAGE, W. P. 2015. Mechanisms of genome evolution of *Streptococcus*. In *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* [online] ISSN 1567-7257, 2015, vol.33, p. 334-342 [cit. 20.1.2017]. Dostupné na internete: <<http://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.007>>.
- BAZOVSKÁ, S. a kol. 2007. *Špeciálna epidemiológia*. Bratislava : Univerzita Komenského v Bratislave, 2007. 340 s. ISBN 978-80-223-2301-7.
- BEDNÁŘ, M. – FRAŇKOVÁ, V. – SCHINDLER, J. – SOUČEK, A. – VÁVRA, J. 1996. *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha : Marvil, 1996. 560 s. ISBN 8594031505280.
- BENTLEY, S. D. et al. 2006. Genetic Analysis of the Capsular Biosynthetic Locus from All 90 Pneumococcal Serotypes. In *PLoS Genetics* [online] ISSN 1553-7404, 2006, vol. 2, no. 3, p. e31 [cit. 28.11.2016]. Dostupné na internete: <<http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020031>>.
- BERAN, J. 2008. *Lexikon očkování*. 1. vyd. Praha : Maxdorf, 2008. 352 s. ISBN 978-80-7345-164-6.
- BOTTKOVÁ, E. 2013. Zavedenie sérotypizácie *Streptococcus pneumoniae* pomocou multiplexnej PCR. Rigorózna práca. Bratislava: Univerzita Komenského, 2013, 104 s.
- BOTTKOVÁ, E. – KLEMENT, C. – MAĎAROVÁ, L. - ČAMAJOVÁ J. – AVDIČOVÁ, M. 2013. *Streptococcus pneumoniae* v NRC pre pneumokokové nákazy. In *Verejné zdravotníctvo* [online]. ISSN 1337-1789, 2013, č. 4 [cit. 12.12.2016]. Dostupné na internete: <<http://casopis.fvszu.sk/wp-content/uploads/2017/01/201304.pdf>>.
- BRITO, D. A. et al. 2003. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by Multiplex PCR. In *Journal of Clinical Microbiology* [online] ISSN 1098-660X, 2003, vol. 41, no. 6, [cit. 29.11.2016]. Dostupné na internete: <<http://jcm.asm.org/content/41/6/2378.full>>

COSTA, N. S. et al. 2016. MLVA Typing of *Streptococcus pneumoniae* Isolates with Emphasis on Serotypes 4, 9N and 9V: Comparison of Previously Described Panels and Proposal of a Novel 7 VNTR Loci-Based Simplified Scheme. In: *PLoS ONE* [online] ISSN 1932-6203, 2016, vol. 11, no. 7, [cit. 28.11.2016]. Dostupné na internete:

<<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0158651>>

DLUHOLUCKÝ, S. 2010. Prevencia pneumokokových infekcií – akútny stav vo svete a u nás. In *Pediatrica pre prax* [online] ISSN 1337-4443, 2010. č. 3, s. 19-25. [cit. 13.11.2016] Dostupné na internete:

<http://www.vzbb.sk/sk/urad/narodne_centra/nrc_pn/ped_s3_pneumokoky_2010_final2.pdf>.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. 2000. DNA: The genetic material. In *An Introduction to Genetic Analysis* [online] ISBN 071673771X, 7th ed. New York: W. H. Freeman, 2000 [cit. 29.11.2016]. Dostupné na internete: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22104/>.

GASC, A. – KAUC, L. – BARRAILLE, P. – SICARD, M. – GOODGAL, S. 1991. Gene localization, size, and physical map of the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. In *Journal of Bacteriology* [online] ISSN 1098-5530, 1991. č. 173(22). [cit. 25.11.2016] Dostupné na internete: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC209245/>>.

HUPKOVÁ, H. – TRUPL, J. – JAKUBÍKOVÁ, J. – BABNIČ, P. 2007. Antibiotická rezistencia a distribúcia sérotypov kmeňov *S. pneumoniae* izolovaných pri akútnom zápale stredného ucha u detí do 5 rokov. In *Antibiotiká a rezistencia* [online] ISSN 1336-1147, 2007. roč. 6, č. 1-2, s. 21-23. [cit. 13.11.2016] Dostupné na internete: <http://www.vzbb.sk/sk/urad/narodne_centra/nrc_pn/antibiotika_1_2_07.pdf>.

CHAGUZA, CH. – CORNICK, J. – EVERETT, D. 2015. Mechanisms and impact of genetic recombination in the evolution of *Streptococcus pneumoniae*. In *Computational and structural biotechnology journal* [online] ISSN 2001-0370, 2015. č. 13, s. 241-247. [cit. 25.11.2016] Dostupné na internete:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4404416/#>>.

KLEMENT, C. a kol. 2009. *Medzinárodné zdravotné predpisy – teória, legislatíva, implementácia, súvislosti*. 1. vyd. Banská Bystrica : PRO, 2009. 440 s. ISBN 978-80-89057-24-5.

- KOMPAŇIKOVÁ, J. – NOVÁKOVÁ, E. – NEUSCHLOVÁ, M. 2013. *Mikrobiológia nielen pre medikov*. 1. vyd. Žilina : EDIS – vydavateľstvo Žilinskej univerzity, 2013. 209 s. ISBN 978-80-554-0827-9.
- KRIŽANOVÁ, O. 2012. *Vybrané biochemické a molekulárne-biologické metódy v lekárskom výskume a medicínskej diagnostike*. Portál Jesseinovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online], posledná aktualizácie 30.8.2012. [cit. 13.12.2016] Dostupné na internete: <<http://portal.jfmed.uniba.sk/clanky.php?aid=188>>. ISSN 1337-7396.
- LARSEN, M. V. et al. 2012. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. In: *Journal of Clinical Microbiology* [online] ISSN 1098-660X, 2012, vol. 50, no. 4, [cit. 29.11.2016]. Dostupné na internete: <<http://jcm.asm.org/content/50/4/1355.full>>
- LÓPEZ, R. – GARCÍA, E. 2004. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. In *FEMS Microbiology Reviews* ISSN 0168-6445, 2004. č. 28, s. 553-580.
- MAĐAR, J. 2004. *Pneumokokové nákazy a ich prevencia*. Martin : ARD s.r.o., 2004. 63 s. ISBN 80-85358-13-1.
- MOSCOSO, M. - GARCÍA, E. 2009. Transcriptional Regulation of the Capsular Polysaccharide Biosynthesis Locus of *Streptococcus Pneumoniae*: a Bioinformatic Analysis. In *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* [online]. ISSN 1756-1663, 2009, vol. 16, no. 3, p. 177-186 [cit. 28.11.2016]. Dostupné na internete: <<http://doi.org/10.1093/dnares/dsp007>>.
- OLEÁR, V. – KRIŠTÚFKOVÁ, Z. – KLEMENT, C. 2014. *Kapitoly z vakcinológie I*. 1. vyd. Banská Bystrica : PRO, 2014. 319 s. ISBN 978-80-89057-52-8.
- PORTER, B. D. et al. 2014. Capsular Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by Latex Agglutination. In: *Journal of Visualized Experiments: JoVE* [online] ISSN 1940-087X, no. 91, [cit. 9.12.2016]. Dostupné na internete: <<http://doi.org/10.3791/51747>>
- PUNINA, N. V. et al. 2015. Whole-genome sequencing targets drug-resistant bacterial infections. In: *Human Genomics* [online] ISSN 1479-7364, 2015, vol. 9, no. 19, [cit. 8.12.2016]. Dostupné na internete: <<http://doi.org/10.1186/s40246-015-0037-z>>

SCHAFFNER, T. O. et al. 2014. A point mutation in *cpsE* renders *Streptococcus pneumoniae* nonencapsulated and enhances its growth, adherence and competence. In *BMC Microbiology* [online] ISSN 1471-2180, 2014, vol. 14:210, 12 p. [cit. 20.1.2017]. Dostupné na internete: <<http://doi.org/10.1186/s12866-014-0210-x>>.

SCHINDLER, J. 2014. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických odborů : 2., doplněné a přepacované vydání*. Praha : Grada, 2014. 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.

VOTAVA, M. a kol. 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno : Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

VOTAVA, M. 2010. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno : Neptun, 2010. 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.

WERNO, A. – MURDOCH, D. 2008. Laboratory diagnosis of Invasive Pneumococcal Disease. In *Clinical Infectious Diseases*, ISSN 1058-4838, 2008, č. 46, s. 926-931.

World Health Organisation (WHO). 2011. Identification and characterization of *Streptococcus pneumoniae*. In: Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual. 2011. 2. vyd. Dostupné na internete: <<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/>>

Internetové zdroje

www1 <http://www.cps.ca/documents/position/acute-otitis-media> [cit. 12.11.16]

www2 <http://www.hpl.sk/ochoreli-ste/choroby/sinusitida> [cit. 12.11.16]

www3 <http://www.hpl.sk/ochoreli-ste/choroby/komunitna-pneumonia> [cit. 12.11.16]

www4 https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_pneumoniae
[cit. 25.11.16]

www5 <http://pranag.physics.iisc.ernet.in/cgi-bin/SPGDB/general.pl> [cit. 25.11.16]

www6 <http://www.applied-maths.com/applications/mlst> [cit. 9.12.2016]

www7 <http://www.mlva.net/> [cit. 9.12.2016]

www8 <http://www.pulsenetinternational.org/protocols/wgs/> [cit. 15.1.2017]

www9 <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html> [cit. 15.1.2017]

www10 <http://www.applied-maths.com/applications/pulsed-field-gel-electrophoresis-pfge-typing> [cit. 20.1.2017]

Zdroje obrázkov

www A : <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/5/07-048769/en/> 13.11.2016

wwwB : <http://femsre.oxfordjournals.org/content/28/5/553> 26.11.2016

wwwC : <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>
19.12.2016