

Metody molekulární diagnostiky bakterií

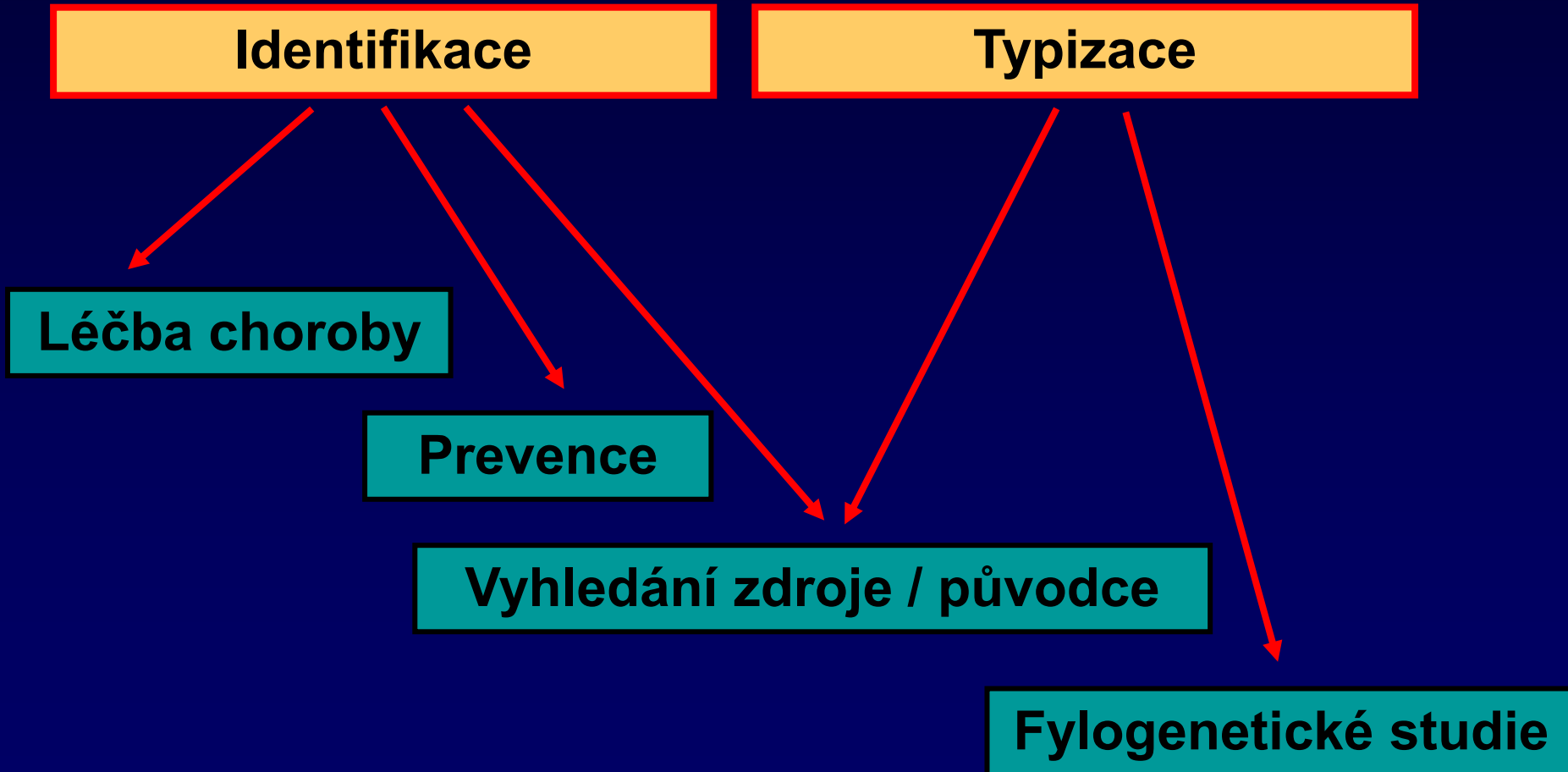
Identifikace bakterií

- Cílem typizace je určení jednotlivých kmenů (nebo klonů), druhů, taxonů jiné úrovně
 - Klinické účely
 - Epidemiologické účely
 - Fylogenetické účely
- Existují dvě velké skupiny metod
 - Fenotypové
 - Tradiční (morfologické, biochemické, sérologické)
 - Citlivost k antibiotikům
 - Chemotaxonomické
 - Fagotypizace
 - MALDI-TOF MS
 - Genotypové – založené na DNA

Molekulární (DNA)-diagnostika

- Využívá stanovení rozdílů v sekvenci DNA
 - Identifikace (konzervované specifické sekvence)
 - 16S rRNA
 - Jedinečné geny
 - typizace (konzervované sekvence s variabilním motivem)
 - Na základě sekvence
 - SNP, alely genů
 - Repetice
 - Mezerníky
 - Fingerprintové metody
- Předpokládá, že jedinci (kmeny) se shodným genomem jsou klonálně příbuzní
- Předpokládá, že rozdíly v sekvenci DNA ovlivňují určité fenotypové znaky (obvykle není nutno studovat fenotyp)
- Nahrazuje jiné typizační metody, např. serologické, biochemické

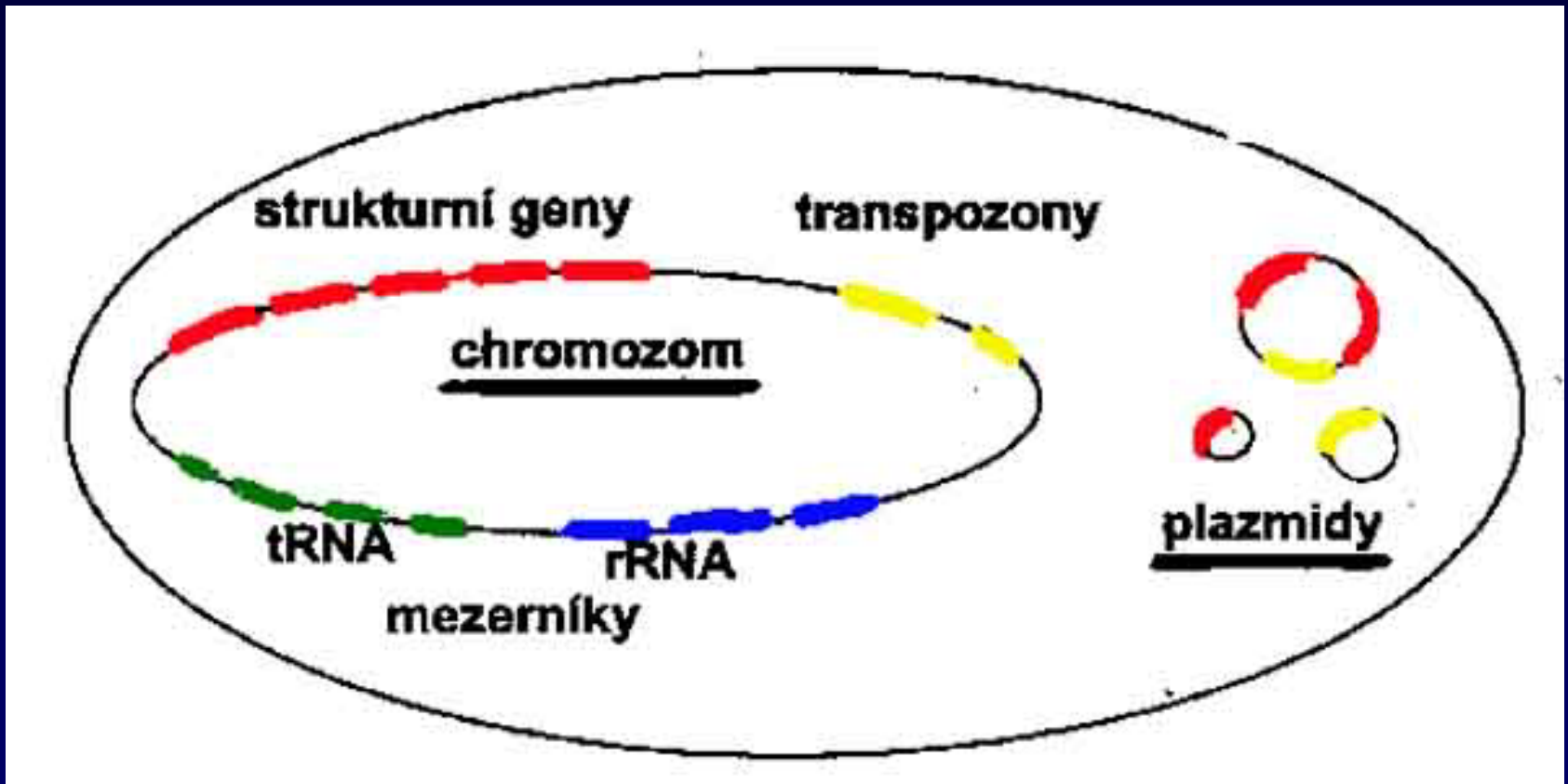
Molekulární diagnostika



Genotypové metody

- Výhodou genotypových metod oproti fenotypovým je
 - nezávislost na expresi specifických genů v umělém prostředí (laboratorní média)
 - genotypové znaky jsou na rozdíl od fenotypových (biotyp, sérotyp, antibiogram) relativně stálé
 - dávají reprodukovatelné výsledky analýz i za různých laboratorních podmínek
 - jsou rychlé a zpravidla nevyžadují předchozí kultivaci mikroorganismů
 - Umožňují identifikaci nekultivovatelných mikroorganismů
 - metody založené na chromozomální DNA mají na rozdíl od fenotypových metod 100% typovatelnost, protože všechny bakterie mají chromozóm a proto se tyto metody zaměřují na stupeň a povahu polymorfismů DNA

Složky prokaryotického genomu a jejich využití pro diagnostiku



Hodnocení kvality typizačního systému

- Typizační systém je charakterizován 7 kritériemi (Maslow, 1993)
 - Typovatelnost
 - Reprodukovatelnost
 - Stálost
 - Rozlišovací síla
 - Epidemiologická shoda
 - Snadnost interpretace
 - Jednoduchost provedení

- **Typovatelnost** je vyjádřena procentem izolátů, které může typizační systém jednoznačně přiřadit k určitému typu, v ideálním případě všechny izoláty
- **Reprodukovatelnost** je schopnost typizačního systému při opakovaném testování přidělit stejnému kmenu znovu stejný typ

- Stálost je biologická vlastnost klonálně odvozených izolátů exprimovat stálé markery během času a generací
 - Stabilita markerů může být přijatelná i při přítomnosti změn pod podmínkou, že typizační systém umožňuje rozpoznání klonální příbuznosti a nevede ke špatné klasifikaci subklonálních variant jako epidemiologicky nepříbuzných

- **Rozlišovací síla** typizačních systémů je definována jako průměrná pravděpodobnost, že rozdílné genotypy budou přiřazeny do dvou nepříbuzných kmenů v populaci daného rodu
 - Je počítána pomocí vzorce Simpsonova indexu diverzity (Hunter a Gaston 1988)
 - Před výpočtem je třeba vyloučit netykovatelné kmeny
 - Tento index závisí na počtu typů a na četnosti rozšíření kmenů každého typu

Simpsonův index diverzity

$$D = 1 - \frac{1}{N(N - 1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

- D je diskriminační index
- N je počet nepříbuzných testovaných kmenů
- S je počet rozdílných typů
- n_j - počet kmenů patřících k j -tému typu

V praxi je přijatelný typizační systém s indexem větším než 0,95, což odpovídá 5% pravděpodobnosti chybného přiřazení nezávislých izolátů ke stejnému klonu

- **Epidemiologická shoda** je schopnost typizačního systému správně klasifikovat do stejného klonu všechny epidemiologicky příbuzné izoláty z dobře popsaného propuknutí infekční choroby
- **Snadnost interpretace** a **jednoduchost provedení** jsou kritéria důležitá pro to, aby metoda byla ochotně přijata klinickými mikrobiology, kteří obvykle postrádají větší odbornost potřebnou k rozpoznání rozdílů mezi kmeny

Srovnání rozlišovací schopnosti genotypových a fenotypových metod

- Větší rozlišovací schopnost zpravidla u metod genotypových
 - není ovlivněna proměnlivostí vyjádření určitého znaku, např. proměnlivostí vyjádření rezistence při stanovování antibiogramu (hlavní typizační metoda v mnoha nemocnicích při epidemických onemocněních).

Charakteristika typizačních systémů.

Typizační systém	Typovatelnost (1 – 2)	Reprodukovatelnost (1 – 4)	Rozlišovací schopnost (1 – 5)
FENOTYPOVÉ METODY			
biotypizace	++	+++	+
citlivost k antibiotikům	++	+++	
sérotypizace	+	++	+++
fagotapizace	+	+++	+
imunobloting	++	++++	++
multilokusová enzymová elektroforéza	++	++++	++
GENOTYPOVÉ METODY			
analýza plazmidů	+	+++	+++
restrikční analýza (RFLP)	++	++	+++
ribotypizace	++	++++	+++
pulzní elektroforéza (PFGE)	++	+++	++++
PCR-RFLP	++	++++	+++
AP-PCR (RAPD)	++	++	++++
sekvencování	++	++++	+++++

Molekulární metody pro detekci polymorfizmů v genomech

- Cílem je charakterizace
 - Chromozomální DNA
 - Plazmidové DNA
 - Celkové genomové DNA
- Posouzení parametrů genomu a výběr relevantních sekvencí pro detekci polymorfizmů
 - Bodové mutace versus události rekombinace
- 2 skupiny metod
 - Přímé
 - Detekce polymorfizmů na úrovni primární struktury (např. sekvenování, real-time PCR pro detekci SNP)
 - Nejpřesnější, ale časově a finančně náročné
 - Nepřímé
 - Poskytují různé typy fingerprintů (otisk DNA) dostupných ve formě obrazů gelu nebo hybridizačních membrán
 - Rozdělují se na techniky
 - bez amplifikace DNA
 - s amplifikací DNA
 - Identifikace konformačních polymorfizmů nukleových kyselin

Metody studia sekvenčního polymorfizmu DNA

- 1. Přímá metoda:
 - Sangerovo sekvencování
 - NGS a sekvenování třetí generace
 - Sekvencování prostřednictvím hybridizací
 - metody pro specifickou detekci jednonukleotidových polymorfizmů
 - Enzymatické reakce na DNA-čipech
 - Hmotnostní spektrometrie
 - real-time PCR s alelově specifickými sondami
- 2. Nepřímé metody: **fingerprinting** (otisky DNA)
 - RFLP – polymorfizmus délek restričních fragmentů
 - AFLP – polymorfizmus délek amplifikovaných fragmentů
 - SSLP – polymorfizmus délek fragmentů s jednoduchou repeticí
 - CFLP – polymorfizmus délek fragmentů vytvořených klevázou
 - SSCP – polymorfizmus konformace jednořetězců
 - DSCP – polymorfizmus konformace dvouřetězců

Přímé metody pro identifikaci

- Více než 100 ortologních genů vhodných pro identifikaci a fylogenetické studie
- Rozdílná úroveň konzervovanosti sekvencí – pro každý rod jiné geny
- Nejpoužívanější lokusy:
 - 16S rRNA
 - Hsp60 (Cpn60, GroEL)
 - RpoB
 - DnaJ/DnaK
 - gyrA

Sekvence genu pro 16S-ribozomální RNA

- Ribosomal Database Project (Release 10)

<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>

The screenshot shows the RDP website homepage with a blue header and navigation menu. The main content area features a 'RDP Release 10, Update 18' announcement from January 25, 2010, with 1,358,426 16S rRNAs. A sidebar on the left lists various online analysis tools. A right sidebar contains a 'News' section with several dated entries. The footer includes logos for the National Science Foundation, Office of Biological and Environmental Research, and National Institutes of Health.

RIBOSOMAL DATABASE PROJECT

BROWSERS | CLASSIFIER | LIBCOMPARE | SEQMATCH | PROBE MATCH | TREE BUILDER | PYRO | TAXOMATIC | SEQCART | ASSIGNGEN

RDP Release 10, Update 18 :: Jan 25, 2010 :: 1,358,426 16S rRNAs

The Ribosomal Database Project (RDP) provides ribosome related data and services to the scientific community, including online data analysis and aligned and annotated Bacterial and Archaeal small-subunit 16S rRNA sequences. [Cite RDP's NAR article](#)

RDP Release 10 brings two major changes to the RDP:

- RDP10 provides new Bacterial and Archaeal alignments with several significant enhancements over the previous RDP 9 alignments.
- Use of the *Infernal* secondary-structure based aligner that provides better support for short partial sequences and handles certain sequencing artifacts in a more intuitive manner.

Explore our online analysis tools:

myRDP	HOVER over any tool item in the menu to see a brief popup description of its features;
BROWSERS	CLICK on the tool menu item to begin working with it.
CLASSIFIER	
LIB COMPARE	
SEQ MATCH	
PROBE MATCH	Be sure to view the video tutorials and visit each tool's help file to use our site to your fullest advantage.
TREE BUILDER	
PYROSEQUENCING PIPELINE	
ASSIGNMENT GENERATOR	
TAXOMATIC	
RDP8.1	

News

02/03/2010 [read more](#)
The latest release of RDP Classifier 2.1 is freely available from sourceforge.

01/25/2010 [read more](#)
RDP 10, Update 18 Released. Hierarchy model used by RDP updated.

10/16/2009 [read more](#)
A 50% bootstrap cutoff is appropriate for short sequences, according to a recent publication.

06/02/2009 [read more](#)
Released myRDP SRA Prepkit beta to help prepare and manage the documents required for submitting Pyrosequencing data to Short Read Archive.

12/05/2008 [read more](#)
SOAP web services for Seqmatch and Classifier now available.

Sponsors:

National Science Foundation

Office of Biological and Environmental Research

National Institutes of Health

SILVA rRNA database



Home SILVAngs Browser Search ACT Download Documentation Projects Jobs Contact

SILVA

Welcome to the SILVA rRNA database project

A comprehensive on-line resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data.

SILVA provides comprehensive, quality checked and regularly updated datasets of aligned small (16S/18S, SSU) and large subunit (23S/28S, LSU) ribosomal RNA (rRNA) sequences for all three domains of life (*Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya*).

SILVA are the official databases of the software package ARB.

For more background information → [Click here](#)

SILVAngs



Check out our service for Next Generation Amplicon data

SILVA Alignment, Classification and Tree (ACT) Service

The SILVA ACT service combines alignment, search and classify as well as reconstruction of trees in a single web application.

SILVA ACT is available at: → www.arb-silva.de/act



SILVA Tree Viewer

The SILVA Tree Viewer is a web application to browse and query the SILVA guide trees.

A technical preview is available at www.arb-silva.de/treeviewer.



News

11.12.2023

SILVA named Global Core Biodata Resource (GCBR)



SILVA is one of fifteen biodata resources worldwide that have been selected in the Global Biodata Coalition's 2023 selection round for Global Core Biodata Resources (GCBRs), increasing the total number of GCBRs to 52. SILVA joins its DSMZ sister databases *BacDive* and *BRENDA* (both selected in 2022) as well as *LPSN* (2023) as GCBR.

07.12.2023

We are hiring!



SILVA is looking for computer scientists as backend and web developer. Our colleagues from the DSMZ Digital Diversity Integration team are also hiring for multiple positions. Find all open positions in our teams [here](#).

14.09.2023

We need you!

Open Jobs@SILVA! Become now part of the SILVA-team! Scientist Molecular Taxonomy, Softwaredeveloper backend Maven/Spring Boot, Softwaredeveloper Web

02.08.2023

SILVA website jobs available again

The TestProbe, TestPrime, and ACT tools are available again as well as custom sequence exports. We continue to work on a cloud-based solution to prevent such long outages in the future. We are very sorry for the inconvenience it caused and thank you for your patience!

[go to Archive ->](#)

User satisfaction survey

SILVA is now part of the German Network for Bioinformatics Infrastructure *de.NBI*.



To evaluate and improve our quality of service we need your feedback. Please help us by participating in this short [survey](#).

- <https://www.arb-silva.de/>

EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>)

- veřejný portál pro analýzu genů pro 16S rRNA a WGS
- pro taxonomii, ekologii a metagenomiku

Search EzBioCloud Database



Escherichia coli

Vibrio

GCA_003063785.1

DSM 10685

Featured services



16S-based ID

Identify a bacterial isolate using 16S rRNA sequences.



16S-based MTP

Taxonomic profiling and functional prediction of metagenomic communities.



EzCOVID19

Detection and characterization of SARS-CoV-2 in metagenomic and isolate data.



Genome-based ID

Identify a bacterial isolate using 16S and Whole Genome Sequences.



Shotgun-based MTP Beta

Taxonomic profiling of metagenomic communities using mWGS data.



WG

Whole Genome Analysis of microbial organisms.

Other services



ANI Calculator

Compare two prokaryotic genome sequences



ContEst16S

Detect potential contaminants using 16S rRNA sequences.

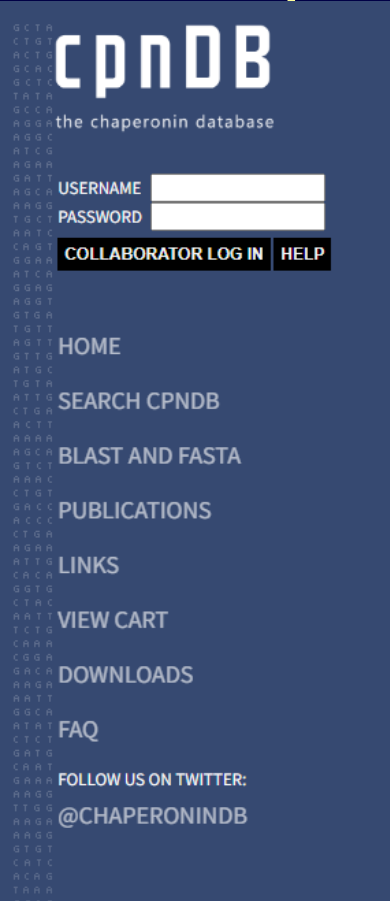
*Do you need NGS service? Please contact us at bs.ngs@cj.net



CJ Bioscience's guide for DIY microbiome sequencing using the Illumina iSeq 100 System is published.

Sekvence genu pro 60 kDa chaperonin (cpn60, Hsp60 nebo GroEL)

- cpnDB: A Chaperonin Database
<https://www.cpnadb.ca/>



The image shows a vertical navigation menu for the cpnDB website. The menu items are: cpnDB (with the tagline 'the chaperonin database'), USERNAME (with a text input field), PASSWORD (with a text input field), COLLABORATOR LOG IN (with a button), HELP (with a button), HOME, SEARCH CPNDB, BLAST AND FASTA, PUBLICATIONS, LINKS, VIEW CART, DOWNLOADS, FAQ, and FOLLOW US ON TWITTER: @CHAPERONINDB.

Welcome to cpnDB

Chaperonins are a diverse family of molecular chaperones that are present in the plastids, mitochondria, and cytoplasm of eukaryotes, into group I (CPN60, also known as Hsp60 or GroEL, found in bacteria, some archaea, mitochondria and plastids) and group II (CCT, TriC eukaryotic cytoplasm).

Chaperonin sequences are useful for phylogenetic studies and have been widely exploited in studies of prokaryotic and eukaryotic evolution. They have also been employed as targets for detection and identification of organisms since a 549-567 bp segment of the cpn60 coding region, the universal PCR primers.

A universal amplification system has been developed for the archaeal thermosome, based on primers that target an approximately 700 bp segment of the cpn60 coding region.

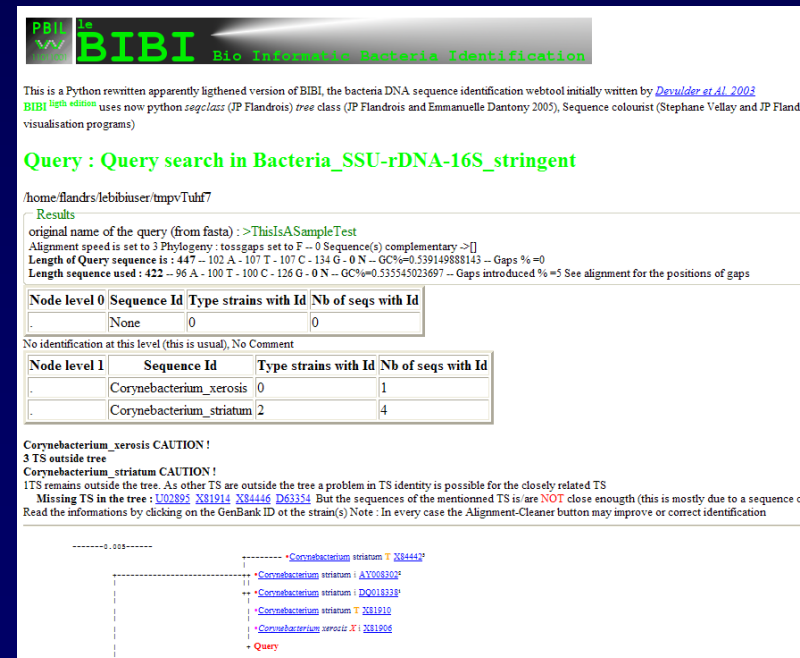
The sequence data included in cpnDB is collected from public databases or generated by a network of collaborators exploiting the cpn60 gene in various microbial ecology studies. The goal of the cpnDB project is to provide a manually curated, taxonomically broad collection of chaperonin sequences.

cpnDB is built and maintained with open source tools. Support for the continuing development and curation of cpnDB is provided by:



Integrované databáze

- Identifikace na základě sekvencí více genů (gyrB, recA, sodA, rpoB, tmRNA, tuf, groES, groEL, dnaK, dnaJ, fusA)
- BioInformatic Bacteria Identification (BIBI)
- UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction



BIBI Bio Informatic Bacteria Identification

This is a Python rewritten apparently lightened version of BIBI, the bacteria DNA sequence identification webtool initially written by [Devulder et al. 2003](#).
BIBI light edition uses now python *seqclass* (JP Flandrois) *tree* class (JP Flandrois and Emmanuelle Dantony 2005), Sequence colourist (Stephane Vellay and JP Flandrois) visualisation programs)

Query : Query search in Bacteria_SSU-rDNA-16S_stringent

/home/flandrs/lebibuser/tmp/vTuhf7

Results
original name of the query (from fasta) : >ThisIsASampleTest
Alignment speed is set to 3 Phylogeny : tossgaps set to F - 0 Sequence(s) complementary -> []
Length of Query sequence is : 447 - 102 A - 107 T - 107 C - 134 G - 0 N - GC%=0.539149888143 - Gaps % = 0
Length sequence used : 422 - 96 A - 100 T - 100 C - 126 G - 0 N - GC%=0.535545023697 - Gaps introduced % = 5 See alignment for the positions of gaps

Node level	Sequence Id	Type strains with Id	Nb of seqs with Id
	None		0

No identification at this level (this is usual), No Comment

Node level	Sequence Id	Type strains with Id	Nb of seqs with Id
	Corynebacterium_xerosis	0	1
	Corynebacterium_striatum	2	4

Corynebacterium_xerosis CAUTION!
3 TS outside tree
Corynebacterium_striatum CAUTION!
1 TS remains outside the tree. As other TS are outside the tree a problem in TS identity is possible for the closely related TS
Mixing TS in the tree : [X31914](#), [X31446](#), [D26334](#) But the sequences of the mentioned TS is are NOT close enough (this is mostly due to a sequence error)
Read the informations by clicking on the GenBank ID of the strain(s) Note : In every case the Alignment-Cleaner button may improve or correct identification

----- 0.005 -----

- *Corynebacterium_striatum T X31446*
- *Corynebacterium_striatum T X31914*
- *Corynebacterium_striatum T DQ018133*
- *Corynebacterium_striatum T X31910*
- *Corynebacterium_xerosis X X31926*
- *Query

MLSA – multilokusová sekvenční analýza pro identifikaci

- fylogenetická analýza založená na analýze částečných sekvencí několika ortologních genů (nebo proteinů)
- konkatenované sekvence
- používaná pro definici druhu v taxonomii
- může nahradit srovnání celogenomových sekvencí

Přímé metody pro typizaci

- SLST – jednolokusová sekvenční typizace
 - Stanovení polymorfní sekvence jednoho genu obsahujícího např. repetitivní hypervariabilní regiony
 - Přiřazení do typů
- Např. spa-typizace u stafylokoků (<https://spa.ridom.de/spatypes.shtml>)
 - PCR amplifikace + Sangerovo sekvenování repetitivní oblasti
 - zvláště zajímavý pro rychlou diagnostiku v nemocničním prostředí
 - Harmonizace mezi laboratořemi

REPETICE

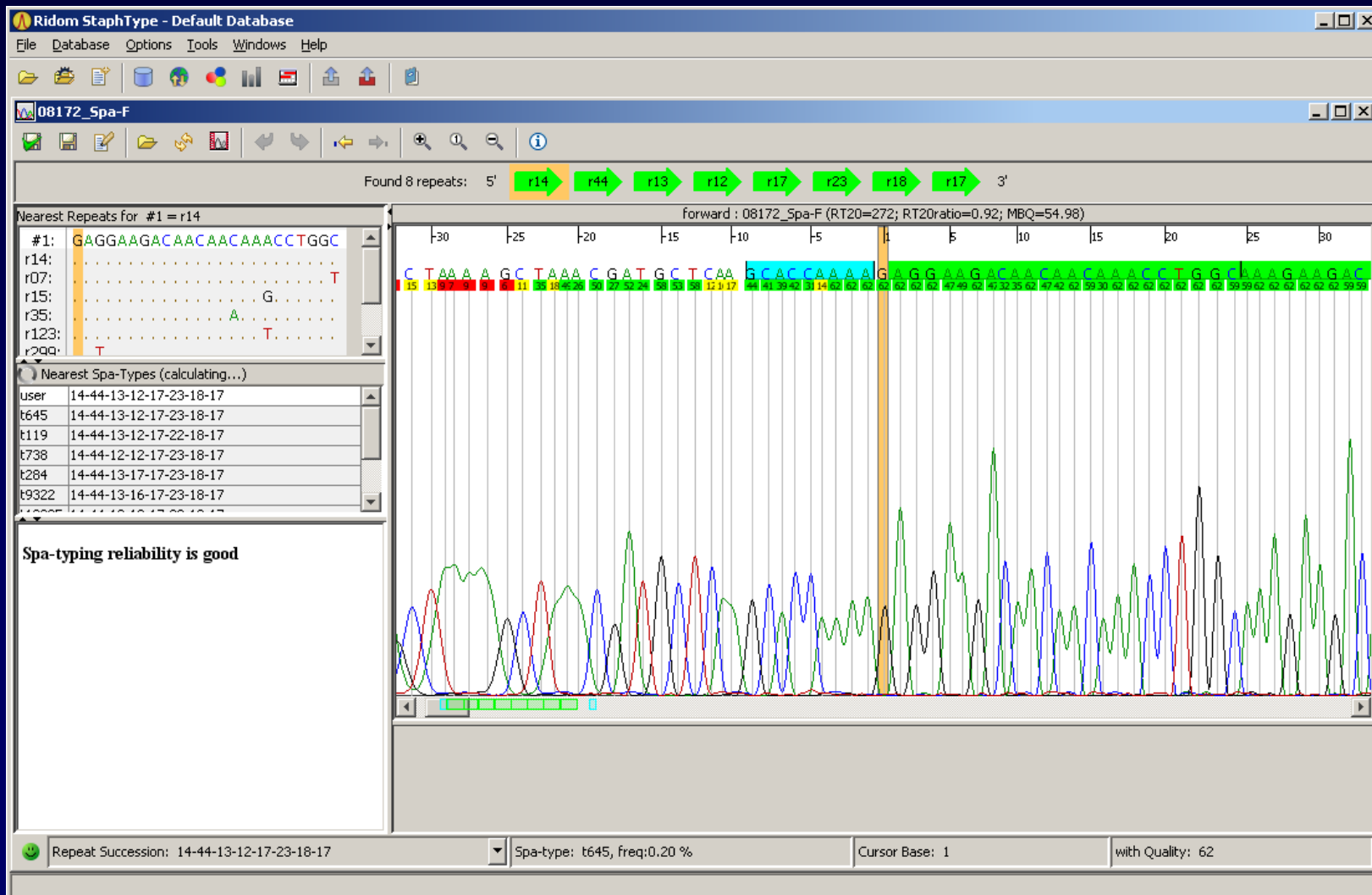
Spa-typy

Repeat ID	Kreiswirth	Sequence
r01		GAGGAAGACAACAACAAGCCTAGC
r02	A1	AAAGAAGACAACAAAAACCTGGC
r03	D2	GAGGAAGACAATAACAACCTGGT
r04	Z1	GAGGAAGACAATAACAAGCCTGGT
r05	C1	AAAGAAGACAACAAAAAGCCTGGC
r06	G2	AAAGAAGACGGCAAAAAACCTGGC
r07	U1	GAGGAAGACAACAACAACCTGGT
r08	X1	GAGGAAGACAACAACAAGCCTGGT
r09	A2	GAGGAAGACGGCAACAACCTGGT
r10	C2	AAAGAAGACAATAACAAGCCTGGT
r11	Y1	GAGGAAGACAATAACAAGCCTGGC
r12	G1	AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT
r13	E1	AAAGAAGACAACAACAACCTGGT

Spa-type	Repeat succession	MLST
t001	26-30-17-34-17-20-17-12-17-16	ST-5, ST-222, ST-228
t002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	ST-5, ST-231
t003	26-17-20-17-12-17-17-16	ST-5, ST-225
t004	09-02-16-13-13-17-34-16-34	ST-45
t005	26-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28	ST-22, ST-23, ST-60
t006	26-23-13-23-31-05-17-17-25-16-28	ST-134
t007	15-12-16-16-16-16-02-25-17	
t008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	ST-8, ST-247, ST-250, ST-254
t009	11-12-21-17-34-24-34-22-24-34-22-33-25	ST-254
t010	26-17-34-17-20-17-12-17-16	ST-5
t011	08-16-02-25-24-24-25	

Ridom StaphType

- příklad jednolokusové typizace genu pro stafylokokový protein A



Přímé metody pro typizaci

- MLST – multilokusová sekvenční typizace
 - Stanovení sekvence několika (obvykle 7) genů rozmístěných pokud možno rovnoměrně genomu
 - Přiřazení sekvencí do alelových typů
 - Kombinace typů alel tvoří sekvenční typ (ST)
- Zavedena u celé řady druhů
- Databáze přístupná na webu
- S vhodnými statistickými algoritmy umožňuje provádět shlukovou analýzu a dedukci klonálních linií

PubMLST.org – databáze

(<https://pubmlst.org/>)

PubMLST Public databases for molecular typing
and microbial genome diversity

[HOME](#) [ORGANISMS](#) [SPECIES ID](#) [ABOUT US](#) [UPDATES](#)

A collection of open-access, curated databases that integrate population sequence data with provenance and phenotype information for over 130 different microbial species and genera.

41,492,243
ALLELES

1,555,511
ISOLATES

1,262,614
GENOMES



Organisms search



Change of data access policy

Please note that registration is now necessary to access allele, profile, and isolate data added after 31 December 2024.

Příklad MLST databáze

Home > Organisms > *Staphylococcus aureus* > *Staphylococcus aureus* typing

Staphylococcus aureus typing database

Change of data access policy:

Please note that registration is now necessary to access allele, profile, and isolate data added after 31 December 2024 for all PubMLST databases. See further details.

Restricted view: Note that you are currently restricted to viewing or downloading data that was submitted on or prior to 2024-12-31. Please log in to access the full dataset.

Query a sequence

Single sequence

Query a single sequence or whole genome assembly to identify allelic matches.

Batch sequences

Query multiple independent sequences in FASTA format to identify allelic matches.

Find alleles

By specific criteria

Find alleles by matching criteria (all loci together)

By locus

Select, analyse and download specific alleles from a single locus.

Search for allelic profiles

By specific criteria

Search, browse or enter list of profiles

By allelic profile

This can include partial matches to find related profiles.

In a batch

Look up multiple allelic profiles together.

→ LOG IN

↑ SUBMISSIONS

↓ DOWNLOADS

+

↗ EXPORT

+

📄 ANALYSIS

+

⚙️ CUSTOMISE

+

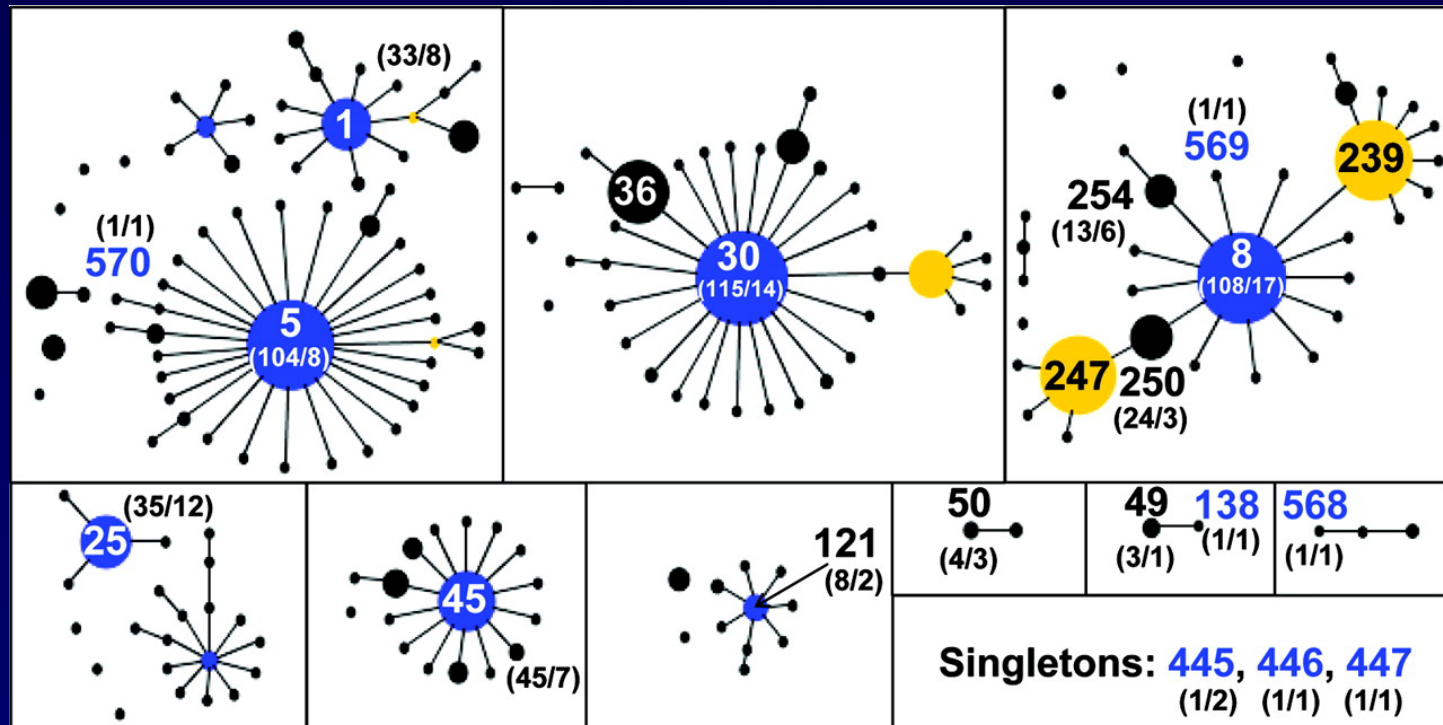
📄 INFORMATION

+

📄 ISOLATES

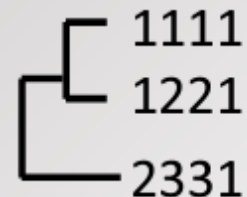
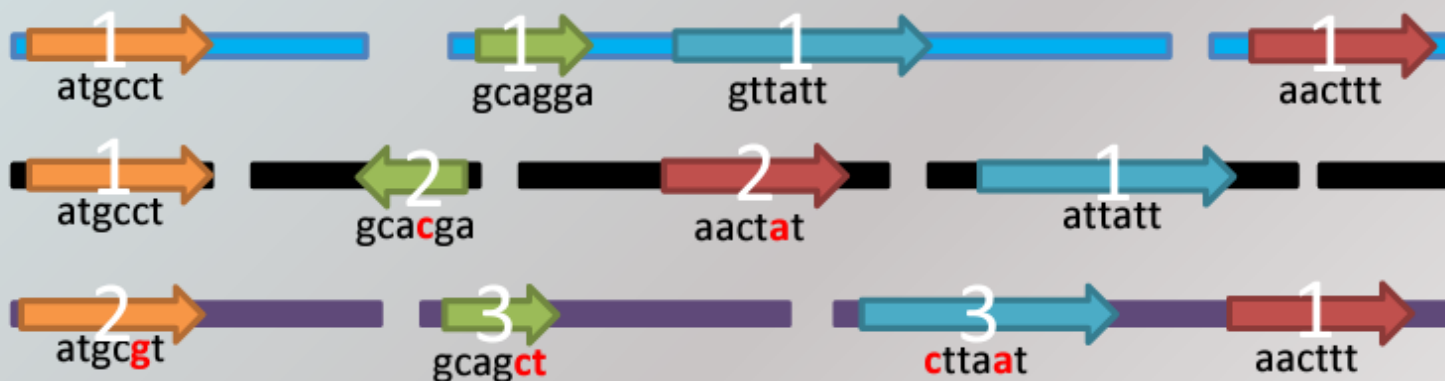
Rekonstrukce fylogeneze klonů

- eBurst – algoritmus pro analýzu MLST typů a definici „klonálních komplexů“
- Klonální komplexy jsou definovány jako ST, které odpovídají centrálnímu genotypu (ST) na čtyřech nebo více lokusech.



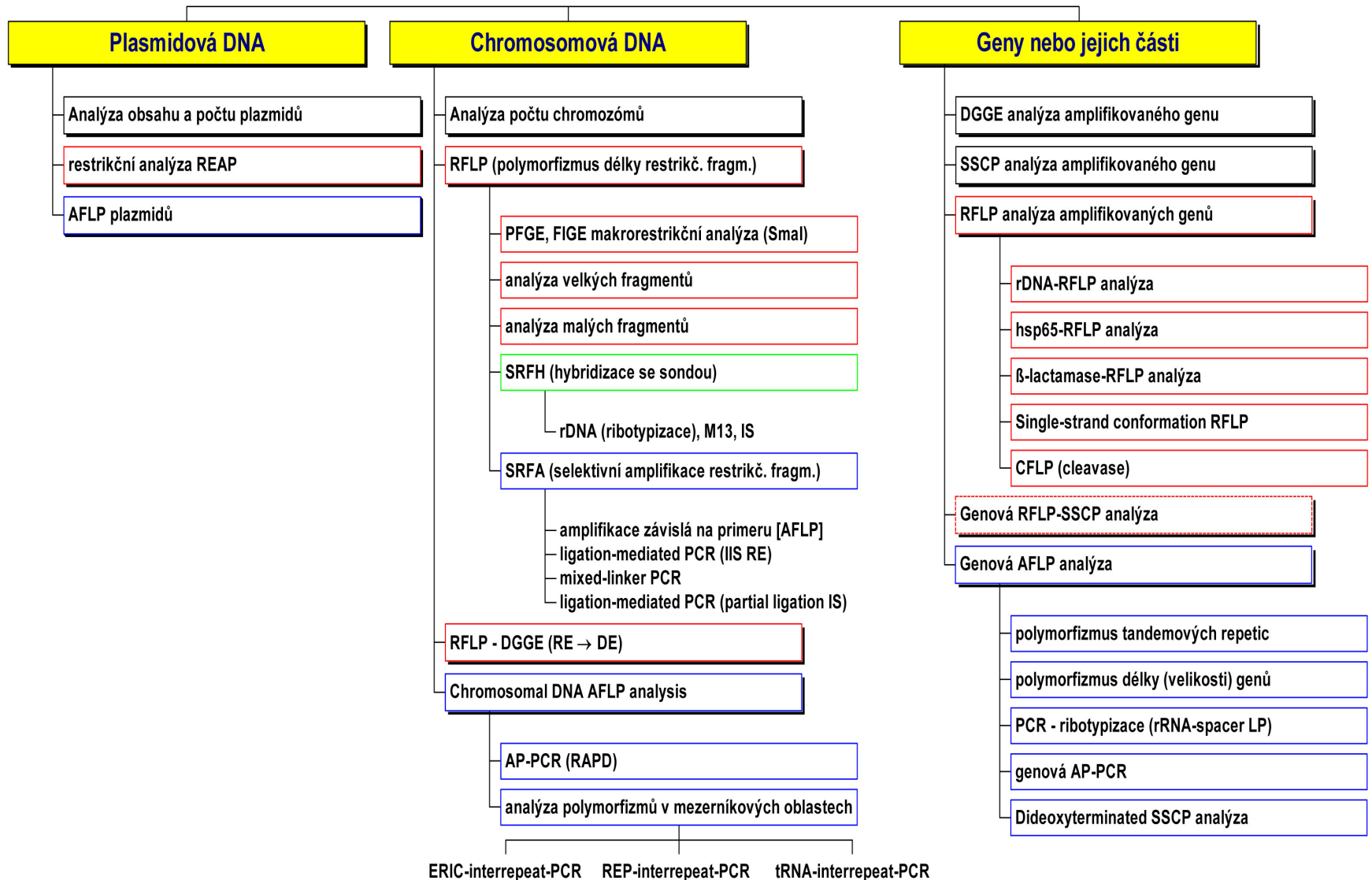
Whole genome multi locus sequence typing (wgMLST)

- Celogenomové sekvenování – finančně výhodnější
- Vyžaduje vývoj databází alel, výběr vhodných alel, výpočetně náročné
- Využití bioinformatických přístupů pro analýzu jednonukleotidových polymorfizmů
 - wgSNP - Whole genome SNP analysis
 - wgMLST - Whole genome MLST
 - cgMLST – Core genome MLST
- Vysoké rozlišení, reprodučibilní, hierarchická nomenklatura



Nepřímé metody pro identifikaci a typizaci

Klasifikace technik pro fingerprinting DNA prokaryot



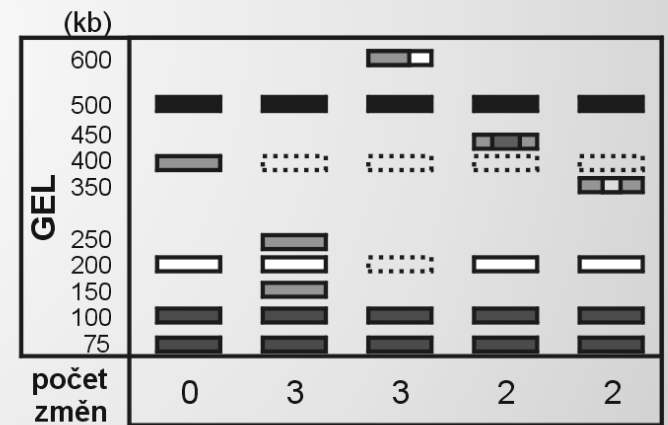
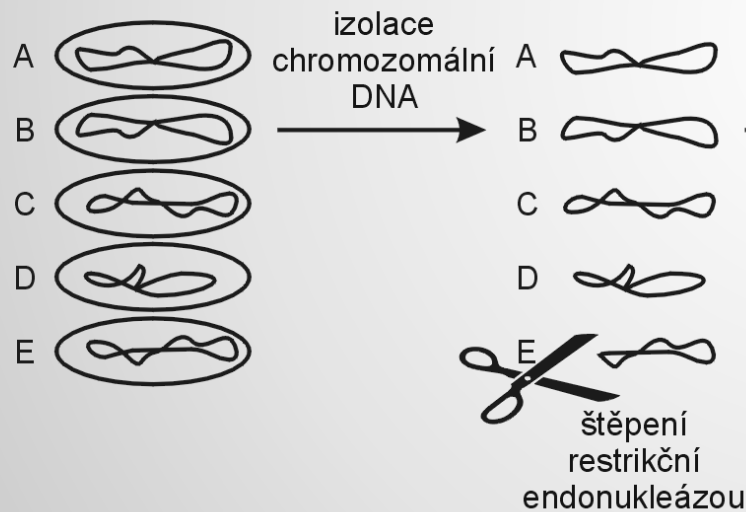
Metody bez amplifikace DNA

Analýza celkové chromozomové DNA

1. Analýza počtu chromozómů (kvasinky *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*; protozoa; *Aspergillus*)
2. Polymorfismus délky restričních fragmentů, restriční analýza (RFLP)
 - Analýza malých fragmentů
 - Analýza velkých fragmentů
 - Makrorestriční analýza (pulzní gelová elektroforéza)
3. Selektivní hybridizace se sondou (Southernův přenos restričních fragmentů na membránu a následná hybridizace)

Princip RFLP

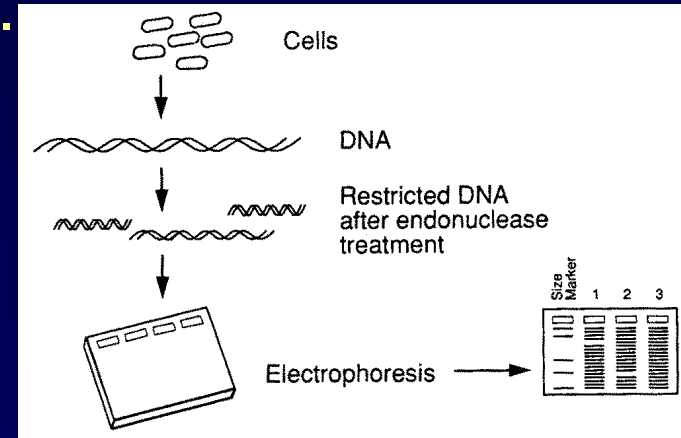
RFLP vzniká přestavbami sekvencí
 inzercemi
 delecemi
 substitucemi bazí uvnitř restričních míst



gelová elektroforéza / Southernova hybridizace

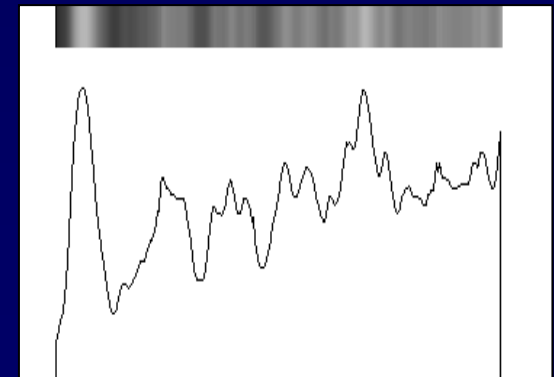
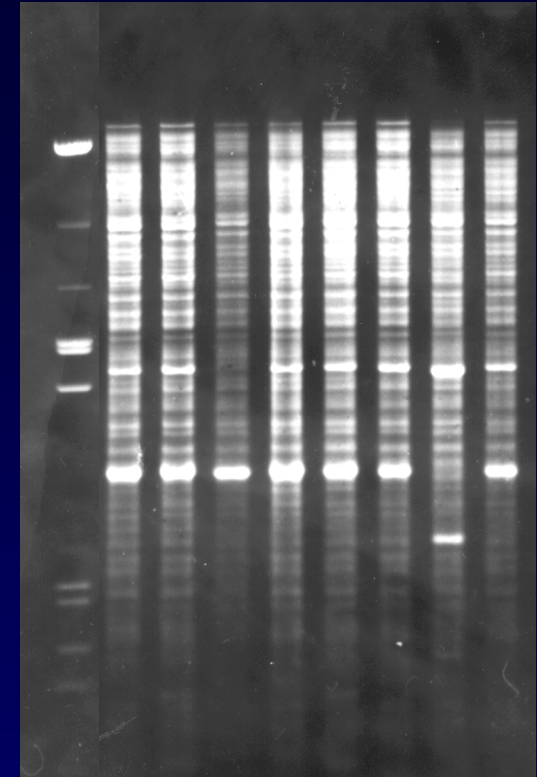
Restrikční analýza chromozomální DNA (REA)

- Jedna z prvních DNA typizačních metod zahrnující analýzu počtu a velikosti restrikčních fragmentů vznikajících štěpením specifickou restrikční endonukleázou (RE).
- Rozdíly mezi fragmenty se označují jako polymorfismus délek restrikčních fragmentů (RFLP).
- Metoda restrikční analýzy zahrnuje následující kroky:
 - izolace chromozomální DNA
 - výběr vhodné RE.
 - štěpení RE, která rozpoznává 4 až 6 bp dlouhé sekvence
 - standardní elektroforéza DNA fragmentů o velikosti 20 000 - 1000 bp v agarózovém gelu
 - vizualizace barvením v etidiumbromidu a densitometrické vyhodnocení



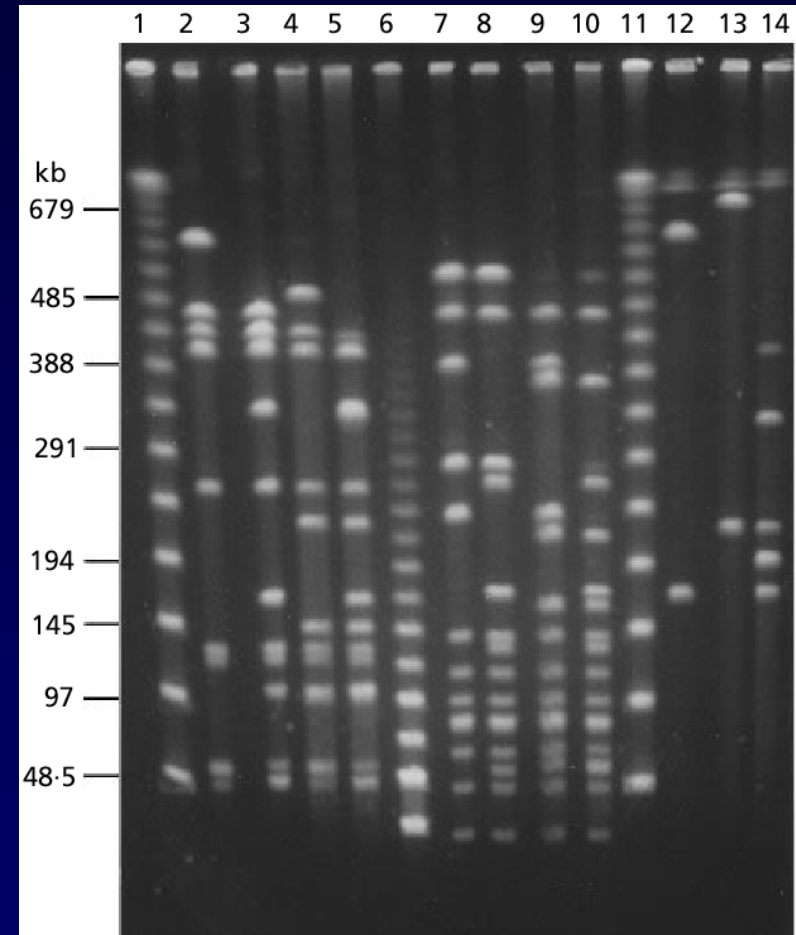
Analýza velkých nebo malých fragmentů

- Nevýhodou RE analýzy celkové chromozomální DNA je velké množství vytvářených restriktů s podobnou pohyblivostí v tradičním agarózovém gelu.
- Výsledkem je spektrum pruhů vizuálně obtížně odlišitelných.
- Pro přesné vyhodnocení míry podobnosti spekter je nutné použít
 - densitometrické měření
 - korelační srovnání densitometrických křivek
- Analýzu zjednodušit hodnocením pouze
 - malých fragmentů 50 – 1000 bp (PAGE + barvení stříbrem)
 - velkých fragmentů 5 - 15 kb (FIGE)
- Přes uvedené obtíže byla REA použita ke studiu příbuznosti u řady bakteriálních druhů *Campylobacter*, *Legionella*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, streptokoky aj.



Makrorestrikční analýza chromozomální DNA pomocí PFGE

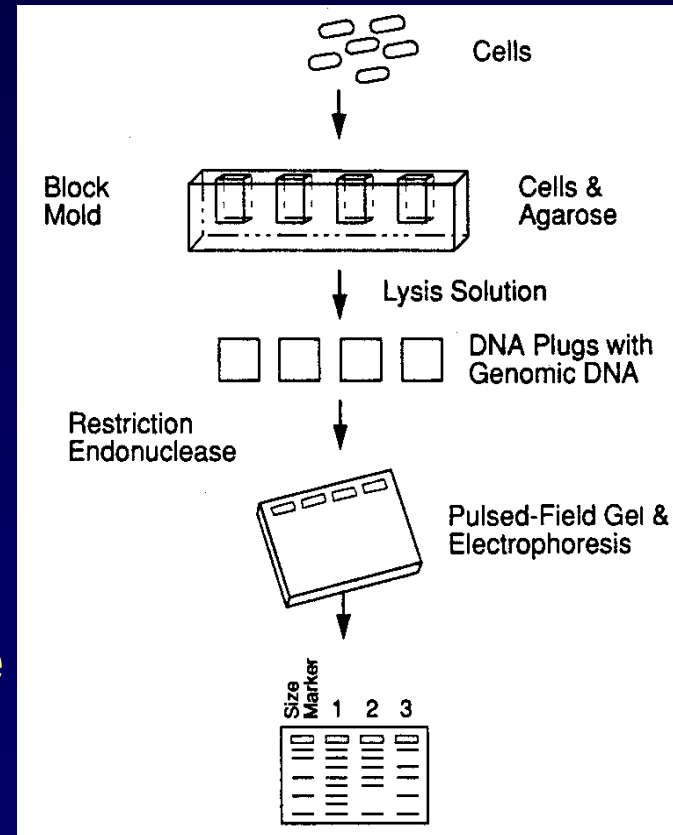
- Metoda slouží pro stanovení RFLP genomové DNA při použití restričních endonukleáz, které štěpí DNA na < 30 místech.
- Vznikají velké fragmenty chromozomální DNA (10 - 1000 kbp), které jsou separovány **pulzní gelovou elektroforézou**.
- Pro izolaci intaktní DNA není vhodná konvenční metoda, ale používá se specifický postup.



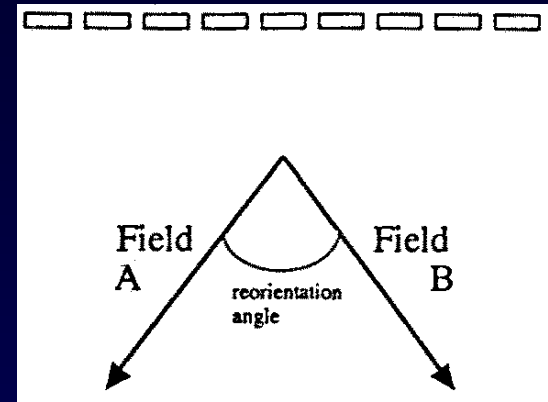
Příklad pulzní gelové elektroforézy DNA různých kmenů *Staphylococcus carnosus*.

Příprava vzorků pro PFGE

- Kultivace buněk do přesně stanovené hustoty
- Smíchání buněk s roztavenou agarózou (10^7 buněk/ml)
- Nalítí směsi do malé formičky
- lyze buněk v agarózových bločcích
- deproteinace DNA
- Promytí a odstranění proteinázy K (fenyl-metyl sulfonyl fluorid, PMSF)
- Štěpení restriční endonukleázou, která štěpí s nízkou frekvencí (velikost fragmentů 50 - 10 000 kbp)
- Vlastní PFGE 5- 10 μ g DNA v jamce
- Barvení gelu v etidiumbromidu



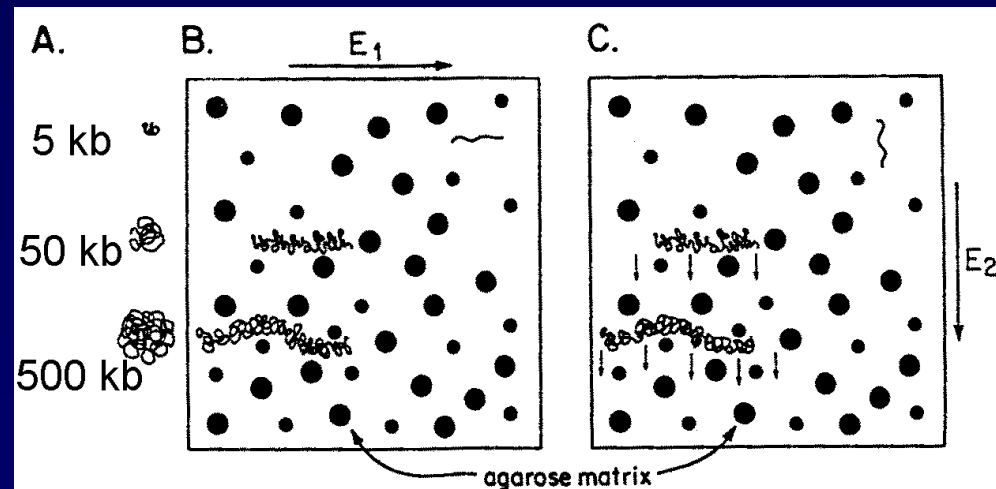
Základní termíny týkající se PFGE



- **Pulzní pole** (pulsed field). Elektroforetický proces, který používá více než jedno elektrické pole, a ve kterém se elektrická pole střídavě aktivují.
- **Pulzní interval** (switch interval, switch time, pulse time). Čas, po který je každé ze střídajících se elektrických polí aktivováno.
- **Reorientační úhel** (reorientation angle). Úhel mezi dvěma střídajícími se elektrickými poli, tj. úhel mezi různými směry, ve kterých molekuly DNA putují.
- **Homogenní pole** (homogeneous field). Elektrické pole, které má uniformní potenciálové rozdíly po celém poli.

Princip separace molekul v pulzním poli

- A. Molekuly DNA o různých velikostech v prostředí bez elektrického pole
- B. Separace molekul v konvenční gelové elektroforéze (molekuly o velikosti 50 - 500 kb se pohybují stejnou rychlostí)
- C. Při pulzní elektroforéze je elektrické pole E_1 přerušeno a nahrazeno polem E_2 v jiném směru. Aby mohla DNA ve směru druhého pole migrovat, musí se nejdříve reorientovat ve směru u nového pole. Čím jsou molekuly větší, tím delší dobu spotřebují ke své reorientaci, a dochází tak ke zpomalení jejich pohybu.
- Pokud jsou obě pole stejná (směr, napětí, pulzní časy), bude výsledná dráha pohybu přímá, složená z jednotlivých „cik-cak“ kroků.



Výběr vhodných restričních enzymů pro makrorestriční analýzu DNA

1. Výběr na základě délky rozpoznávací sekvence RE

Délka rozpoznávací sekvence by měla být > 6 bp

*Sfi*I 5' GGCCN↓NGGCC 3' příklad RE s 10 bp rozpoznávací sekvencí

*I-Sce*I 5' TAGGG↓ATAA↑CAGGGTAAT 3' příklad intronem kódované endonukleázy s 18 bp dlouhou rozpoznávací sekvencí

2. Výběr na základě obsahu GC

Bakteriální druhy se velice liší v obsahu GC v jejich genomech.

Enzymy s GC-bohatou rozpoznávací sekvencí jsou vhodné pro AT-bohaté genomy

*Sma*I 5' CCC↓GGG 3' *Not*I 5' GC↓GGCCGC 3'

a enzymy s AT-bohatou rozpoznávací sekvencí jsou vhodné pro GC-bohaté genomy.

*Ssp*I 5' AAT↓ATT 3' *Swa*I 5' ATTT↓AAAT 3'

3. Výskyt určitých sekvencních motivů v rozpoznávací sekvenci

Přítomnost sekvence odpovídající terminačnímu kodonu v rozpoznávacím místě RE může ovlivnit frekvenci štěpení.

*Xba*I 5' T↓C TAGA 3' amber

4. Restriční endonukleázy citlivé na metylaci typu CpG jsou vhodné eukaryotické DNA

Některé enzymy neštěpí DNA jestliže se v rozpoznávacím místě vyskytuje 5-metylcytozin.

*Mlu*I 5' A↓C*GC*GT 3' tento enzym štěpí savčí DNA méně často než *Sfi*I

Intrpretace výsledků PFGE při typizaci bakterií

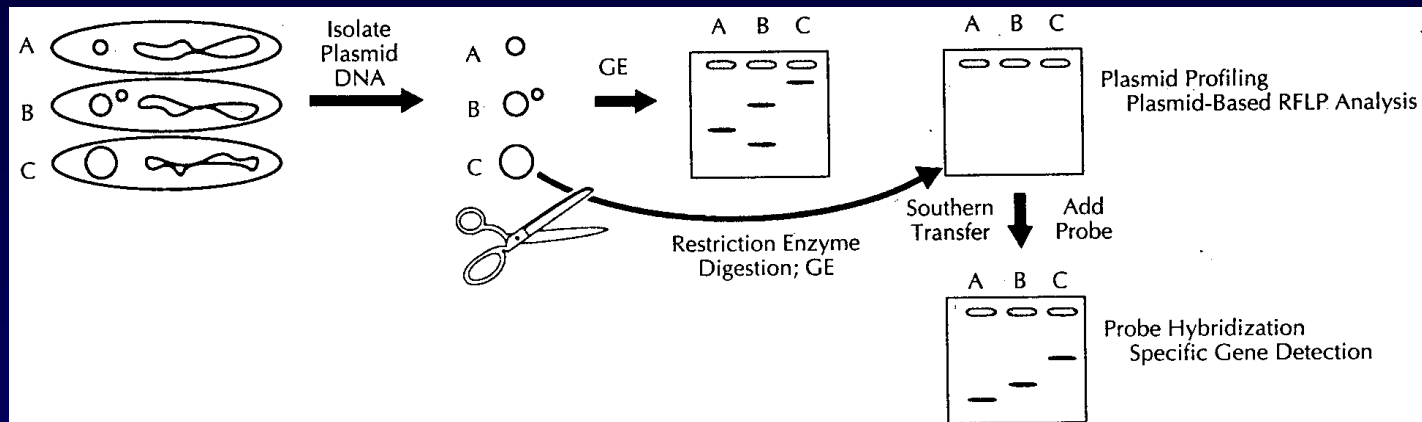
Typ genetické změny	Původní počet fragmentů	Výsledek v PFGE ve vztahu k standardnímu kmeni	Výsledný počet fragmentů
Bodová mutace tvorba RE-místa	5	Ztráta 1 fragm. standardního kmene, vznik 2 menších fragm. (suma velikostí se rovná velikosti fragm. st. kmene) 3 rozdíly ve fragmentech	6
Bodová mutace ztráta RE-místa	5	Vznik nového většího fragm., nepřítomného u st. kmene a ztráta 2 malých fragm. 3 rozdíly ve fragmentech	4
Inzerce fragm. DNA bez RE-místa	5	Počet fragm. stejný, vznik většího fragm. 2 rozdíly ve fragmentech	5
Delece fragm. bez RE-místa	5	Počet fragm. stejný, vznik menšího fragm. 2 rozdíly ve fragmentech	5

Kritéria pro interpretaci PFGE

Kategorie	Počet genetických změn u standardního kmene	Počet změn ve velikostech fragmentů oproti standardnímu kmeni	Epidemiologická interpretace
Nerozlišitelný (identický)	0	0	Izolát je součástí epidemie
Úzce příbuzný	1	2 – 3	Izolát je pravděpodobně součástí epidemie (z 1 pacienta při opakované izolaci)
Pravděpodobně příbuzný	2	4 – 6	Izolát je příbuzný kmenům z epidemie (nemusí být součástí)
Odlišný (nepříbuzný)	3 a více	7 a více	Izolát není součástí epidemie

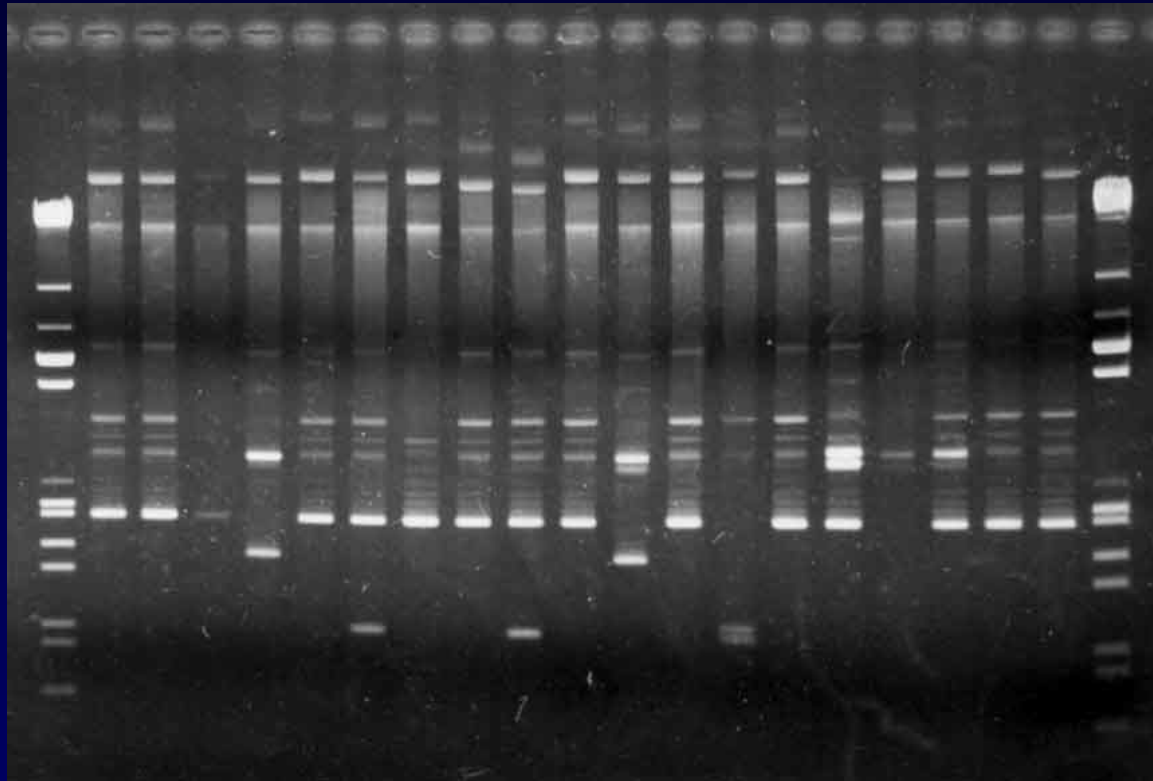
Analýza plazmidové DNA

- Analýza obsahu a počtu plazmidů
- Restrikční analýza plazmidové DNA (REAP)
- Hybridizace se sondou - detekce specifických genů pro
 - virulenci
 - rezistenci k antibiotikům a antimikrobiálním chemoterapeutikům



- Přenos plazmidů mezi kmeny (i mezi různými druhy a rody) se může uskutečňovat:
 1. Konjugací
 2. Transdukcí
 3. Fágem zprostředkovanou konjugací
- Plazmidová analýza je rychlá, jednoduchá a levná metoda.
- Má následující nevýhody:
 - kmeny bez plazmidů jsou netypovatelné
 - interpretace plazmidových profilů není jednoznačná (superhelicita)
 - dlouhodobá stabilita plazmidů je diskutabilní

- Příklad analýzy plazmidů u *Staphylococcus aureus* z epidemie na JIP v Olomoucké nemocnici.

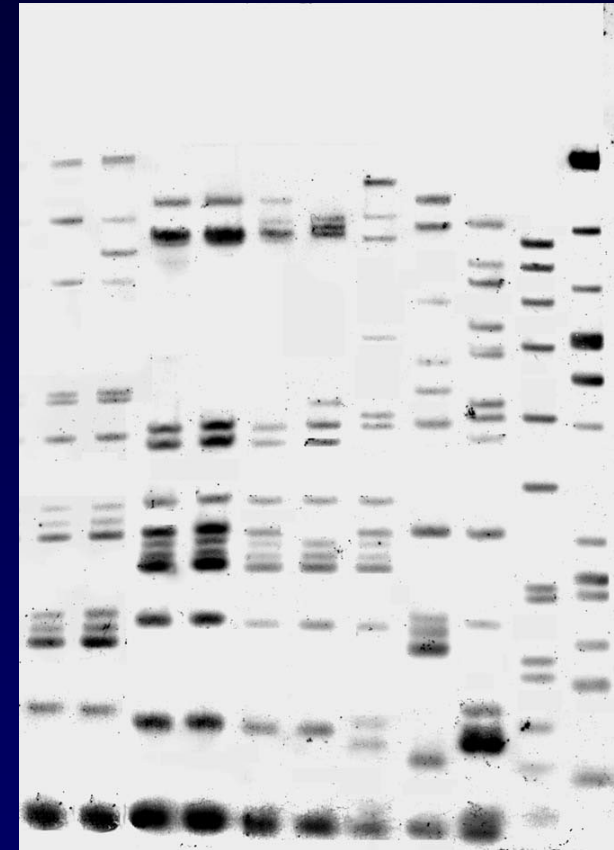
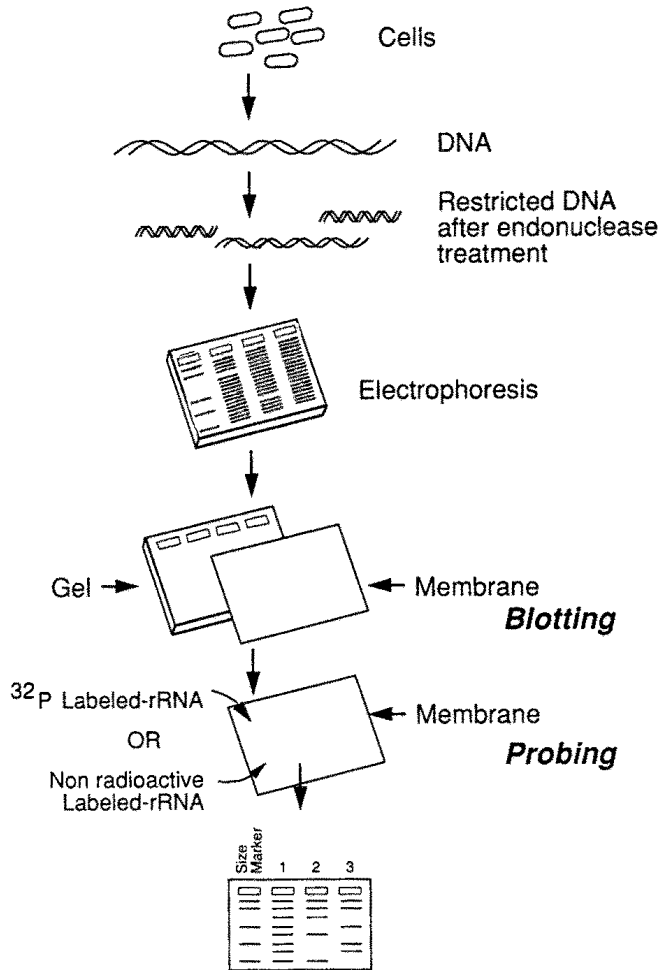


- V současné době se plazmidová analýza používá jako doplňková typizační metoda u gramnegativních (*Salmonella*, *Neisseria*, *Escherichia*) i grampozitivních (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Helicobacter*) bakterií.

Selektivní hybridizace restrikčních fragmentů (SRFH)

- DNA hybridizační diagnostické metody využívají Southernův přenos (1975) pro detekci a lokalizaci vybraných sekvencí, což umožní zjednodušení RFLP analýzy snížením počtu srovnávaných fragmentů.
- Základní metodické kroky při SRFH
 - štěpení celkové chromozomální DNA restrikčním enzymem
 - separace fragmentů pomocí elektroforézy
 - přenos fragmentů z gelu na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu
 - hybridizace DNA navázané na membráně s jednou nebo více značenými sondami homologickými se zkoumanými geny
 - detekce navázané sondy
 - sondy značené radioizotopy + autoradiografie
 - sondy značené neradioaktivně (digoxigenin, biotin, fluorescein, atd.) a následná detekce zahrnující enzym (AP) a barvotvorný substrát nebo enzym a chemiluminiscenční substrát
 - **vyhodnocení RFLP**

Princip selektivní hybridizace



Příklad hybridizace se sondou specifickou pro 16S rDNA.

Přehled používaných sond pro SRFH u prokaryot

1. Náhodně klonované sondy

- Relativně stabilní oblasti bakteriálního chromozómu
 - Použití: *Legionella*, *Brucella*

2. Sondy specifické pro geny kódující metabolické faktory nebo faktory virulence

- Sondy je nutné připravit individuálně pro určité bakteriální druhy, tzn. že tento přístup není použitelný obecně.
- Sekvence některých genů jsou velice konzervativní a jsou proto nevhodné k přípravě sond, naopak geny s určitou sekvenční variabilitou, případně geny vyskytující se ve více kopiích jsou velice vhodné.
 - Použití: *Pseudomonas aeruginosa*: gen pro exotoxin A
 - *Staphylococcus aureus*: mec (determinant meticilinové rezistence)
- Genově specifické sondy je možné využít k hybridizaci s makrorestrikčními fragmenty separovanými pomocí PFGE

3. Sondy odvozené z vícekopiových elementů typu inzerčních sekvencí a transpozonů

- Inzerční sekvence (IS) jsou transponovatelné repetitivní DNA elementy nacházející se v genomu prokaryotických a eukaryotických organismů.
- Přítomnost elementu na určitých místech chromozómu je odrazem chromozomálních přestaveb během evoluce.
- Hybridizace se sondami připravenými z IS elementů vykazuje vysokou reprodukovatelnost a vysokou diskriminační schopnost související s přítomností těchto elementů ve více lokusech na chromozómu.
- Bakteriální IS elementy mají na koncích obvykle 10-40 bp dlouhé obrácené repetice, sonda se proto připravuje z vnitřních sekvencí elementu.
- Výběr restriktivní endonukleázy a vhodného elementu pro přípravu sondy je nutné provést pro každý bakteriální druh.
 - Použití: *Mycobacterium tuberculosis* IS6110
 - další druhy mykobakterií
 - *Staphylococcus aureus* IS257/431

4. Sondy připravené z dalších repetitivních sekvencí

- Pro stanovení polymorfizmů metodou SRFH byly použity některé krátké repetitivní sekvence obecně přítomné v genomech organismů.
- Pouze některé repetice jsou obecně použitelné:
 - 15-bp repetice z pozdního genu *coa* z bakteriofága M13
 - *Escherichia coli*
 - *Staphylococcus*
 - polymorfní tandemová repetice z mykobakterií
 - *Mycobacterium tuberculosis* (MPTR-SRFH)
 - repetitivní sekvence označovaná BOX
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - náhodné trinukleotidové repetice jako např. (GTG)₅
 - *Salmonella*, *Shigella* a *Mycobacterium*, grampozitivní koky.

5. Sondy připravené z dalších variabilních genetických elementů integrovaných v chromozómu

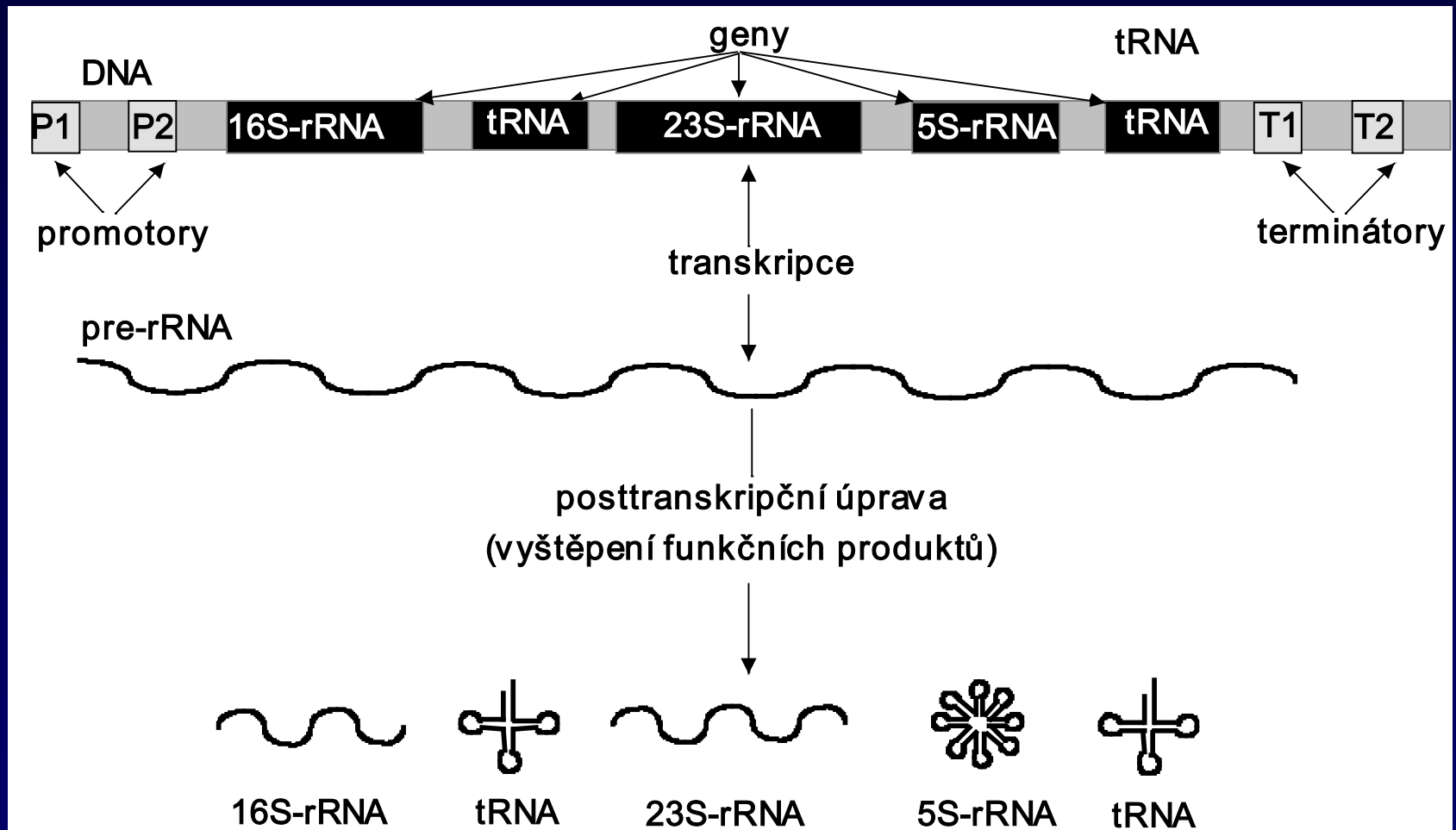
- Profágy
- Plazmidy

Princip ribotypizace

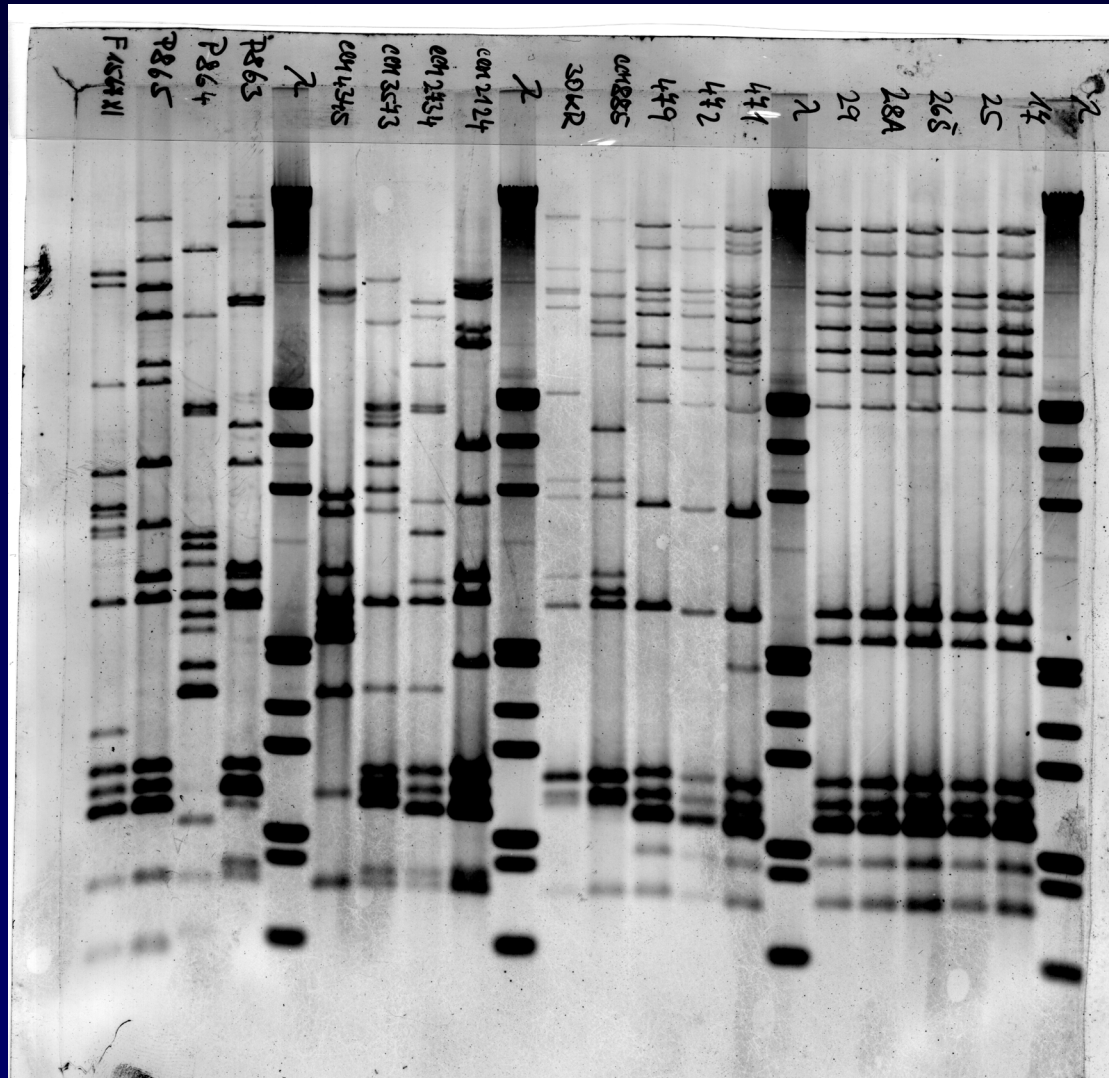
- Ribotypizace zahrnuje fingerprinting restričních fragmentů genomové DNA, které obsahují celý nebo část genu kódujícího 16S a 23S rRNA.
- Hlavní výhody ribotypizace:
 - Sekvence genů pro ribozomální RNA jsou velice konzervativní, proto pro ribotypizaci všech Eubakterií může být použita jediná sonda.
 - Jelikož většina bakterií obsahuje několik ribozomálních operonů, získáme po hybridizaci dostatečné množství fragmentů umožňující mezidruhové i vnitrodruhové odlišení kmenů.

Charakteristika bakteriálního *rrn* operonu

- rRNA-operon (*rrn* operon) se vyskytuje na bakteriálním chromozómu v několika kopiích.

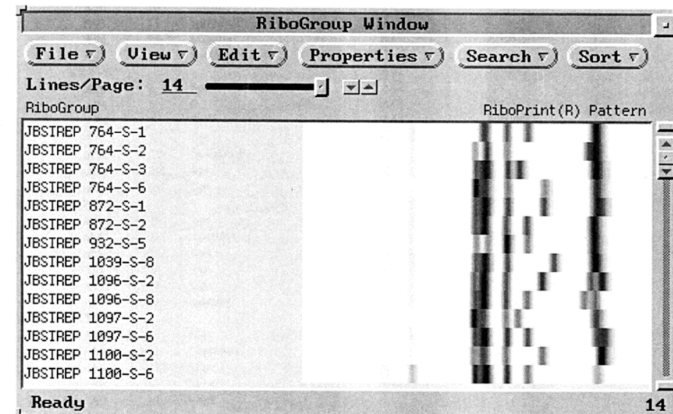
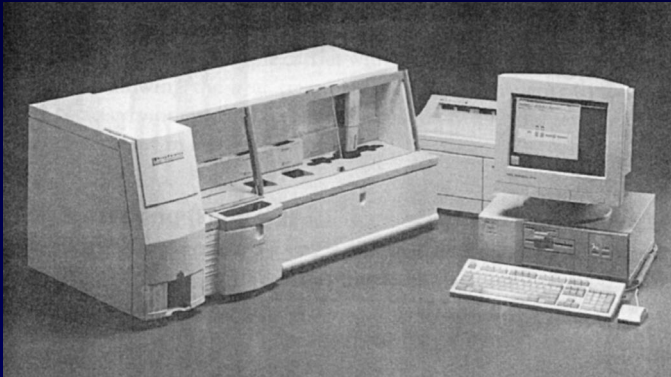
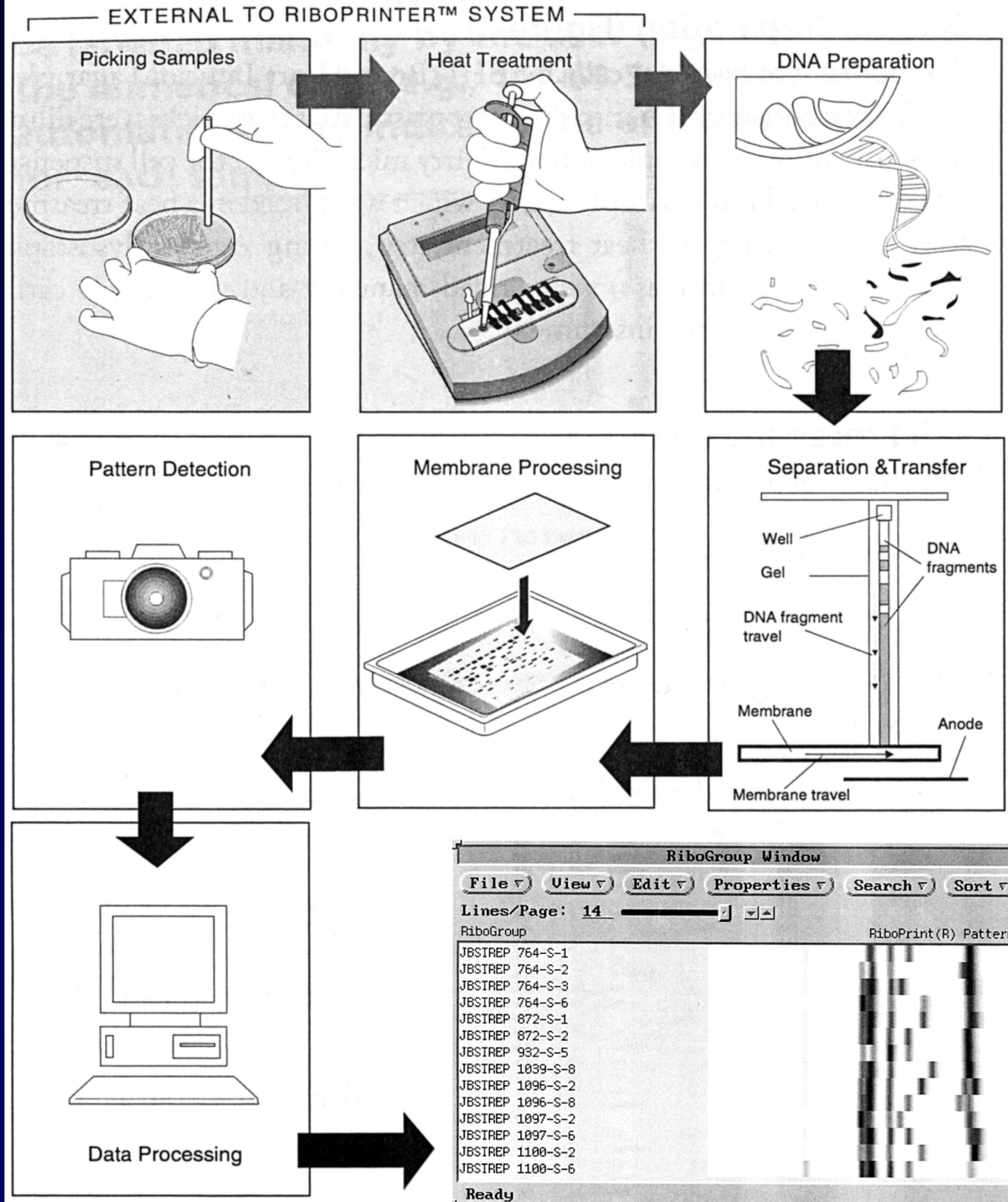


Příklad ribotypu



Automatizace ribotypizace

RiboPrinter™ System Work Flow



Interpretace elektroforetických vzorů proužků a konstrukce dendrogramů

- Otisk DNA je výsledkem většiny molekulárních metod.
- Získaný vzor, který je viditelný na obarvených elektroforetických gelech nebo vyvolaných hybridizačních membránách
 - Je specifický pro izoláty určitého klonálního původu
 - Vzorem se rozumí skladba určitých znaků (kvantitativně vyjádřených) jimiž se vyznačuje daný objekt.
 - Znakem je fragment DNA určité velikosti, u kterého se hodnotí přítomnost nebo nepřítomnost nebo jeho plocha.
- Při DNA-typizaci jedinců získáme velkou množinu dat, kterou je třeba převést do prezentovatelné formy určením tříd nebo skupin.
- K tomuto účelu se využívá **shluková analýza**
 - využívá se k nalezení hierarchického seskupování množin dat s mnoha proměnnými
 - redukuje počet objektů jejich umístěním do skupin

Shluková analýza

1. Metody nehierarchické
 - dávají jednoduché rozdělení, které optimalizuje homogenitu uvnitř skupiny
2. Metody hierarchické
 - členové níže zařazených shluků se stávají členy větších výše zařazených shluků, výsledkem je zobrazení souhrnu jejich hierarchie
 - A. Dělicí
 - Začínají s předpokladem, že všechny objekty jsou částí jednoho shluku
 - Algoritmus štěpí tento velký shluk krok za krokem dokud každý objekt netvoří samostatný shluk
 - B. Aglomerační
 - Na začátku každý shluk obsahuje jeden objekt
 - Shluky jsou postupně spojovány
 - cílem obdržet přímé znázornění příbuznosti mezi objekty
- Výsledek hierarchického shlukování je obvykle zobrazen jako dendrogram, ve kterém jsou zobrazeny následné jednotky shluků společně s hodnotami podobnosti vedoucím k těmto jednotkám

Algoritmus hierarchických aglomeračních metod shlukování

1. Vytvoření množiny dat.

- Soubor hodnot, které nabývají objekty na základě množství znaků.

2. Transformace dat.

- Sjednocení jednotek, vyřazení kvalitativně rozdílných znaků.

3. Sestavení matice podobnosti nebo rozdílnosti.

- Na základě měření podobnosti nebo rozdílnosti každého páru objektů.

4. Shlukování.

- Výběr vhodného algoritmu, což je v podstatě vztah pro opakovaný výpočet rozdílnosti nebo podobnosti nového shluku s ostatními shluky.

5. Dendrogram.

- Znázornění postupného shlukování jednotlivých objektů grafickou formou.

Měření podobnosti.

- Při určování podobnosti elektroforetického vzoru (dvou drah proužků) a tím i podobnosti mezi dvěma izoláty se využívají koeficienty podobnosti založené na
 - Přítomnosti nebo absenci proužků
 - denzitometrických hodnotách.
- Koeficienty založené na prouzcích

- *Jaccardův koeficient:*

$$S_{i,j} = \frac{n_{i,j}}{n_i + n_j - n_{i,j}}$$

- *Diceho koeficient:*

$$S_{i,j} = \frac{2n_{i,j}}{n_i + n_j}$$

- *Plošně citlivý koeficient:*

$$S_{i,j} = \frac{A_{i,j}}{n_i + n_j + n_{i,j}}$$

$$A_{i,j} = \sum_{k=1}^{n_{i,j}} \frac{\alpha}{\alpha + |B_{i,k} - B_{j,k}|}$$

$S_{i,j}$ = podobnost mezi i -tou a j -tou řadou proužků

n_i = počet proužků v i -té dráze

n_j = počet proužků v j -té dráze

$n_{i,j}$ = počet odpovídajících si proužků v i -té a j -té dráze

$A_{i,j}$ = hodnota vycházející z počtu odpovídajících si proužků v i -té a j -té dráze, zohledňující rozdíly v plochách odpovídajících si proužků

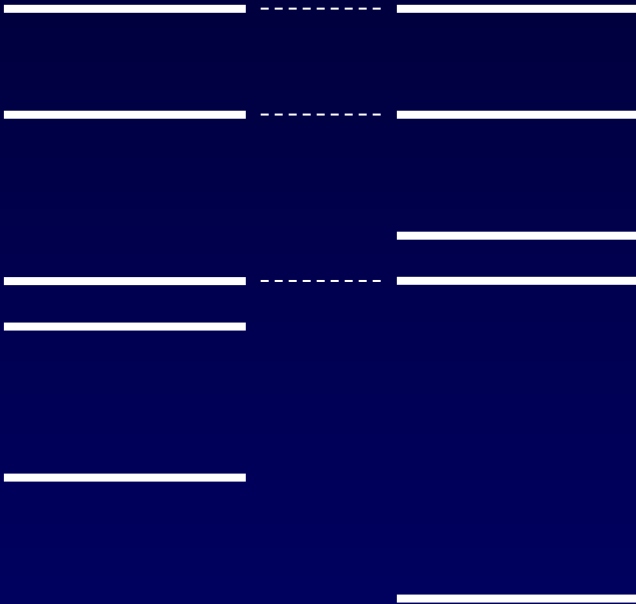
α = konstanta

$|B_{i,k} - B_{j,k}|$ = absolutní hodnota rozdílu ploch k -tých odpovídajících si proužků v i -té a j -té dráze

Výpočet koeficientu podobnosti

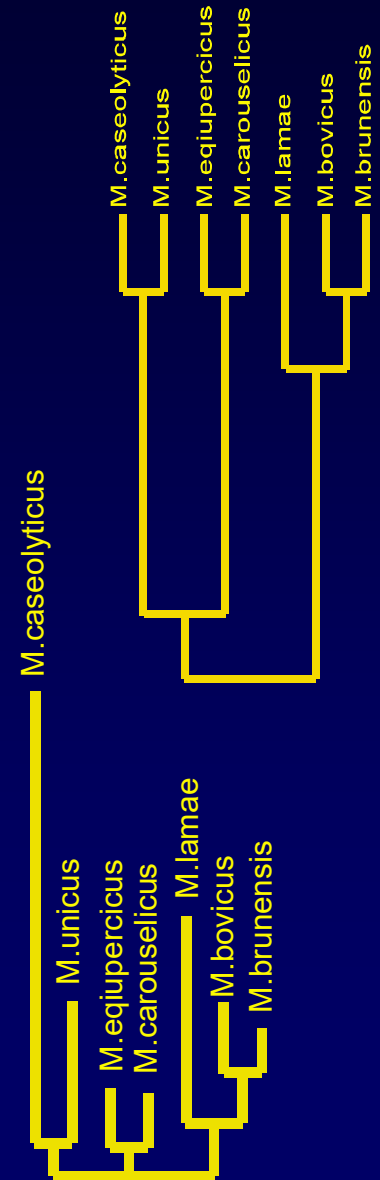
A

B

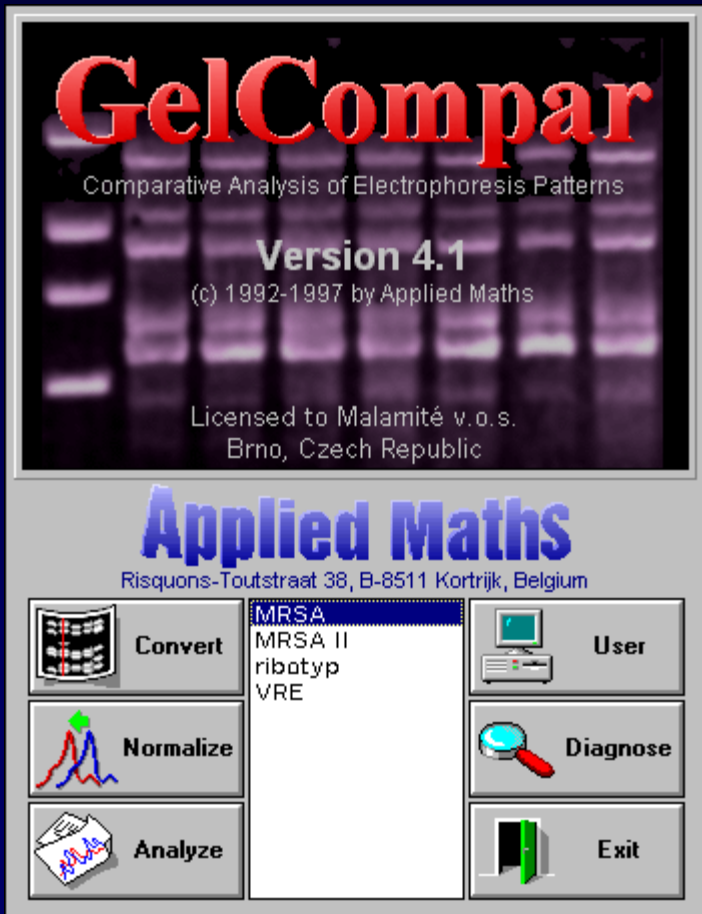


Nejčastěji používané metody pro shlukování

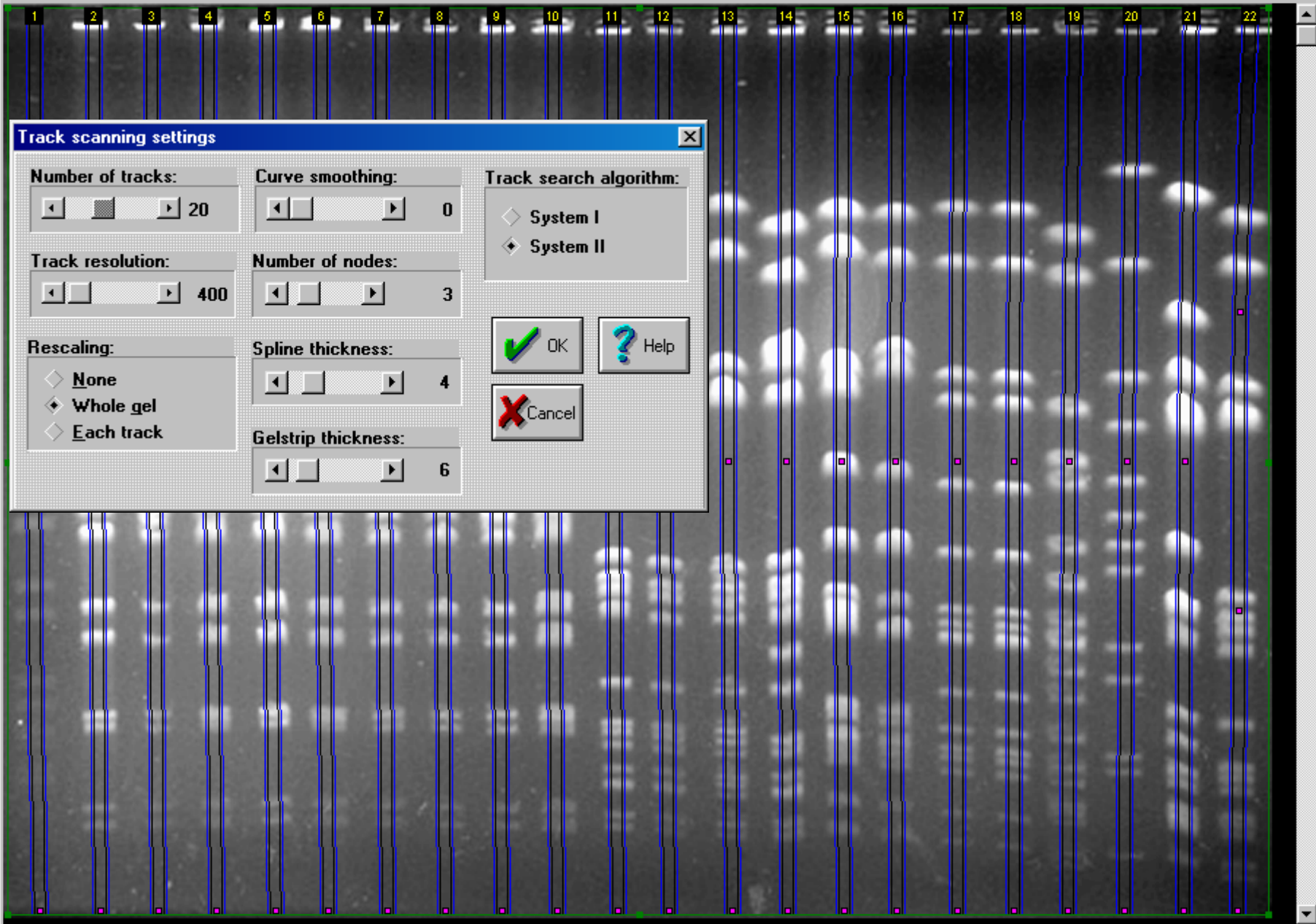
- Metoda nevážených průměrů párových skupin (unweighted pair group average method, UPGMA).
 - Shluky jsou spojovány na základě průměrné vzdálenosti mezi všemi členy ve dvou skupinách.
 - Tato metoda se využívá při vyhodnocování otisků DNA (elektroforetických vzorů)
- Jednoduché spojování (neighbour joining, metoda nejbližšího souseda).
 - Shluky jsou spojovány na základě nejmenší vzdálenosti (největší podobnosti) mezi dvěma skupinami.
 - Metoda má použití při sestavování fylogenetických stromů odvozených z porovnávání částečných sekvencí konzervovaných genů, např. 16S a 23S rRNA.



Software pro 1D gely



- Applied Maths: GelCompar
- BIO-RAD: Quantity One
- KODAK: Molecular Imaging Software
- Scanalytics: GELLAB
- Biocompare: Gel Doc
- Fotodyne: Phoretix
- Jenson: UVIssoft Gel Analysis



Track scanning settings

Number of tracks:

Curve smoothing:

Track search algorithm:
 System I
 System II

Track resolution:

Number of nodes:

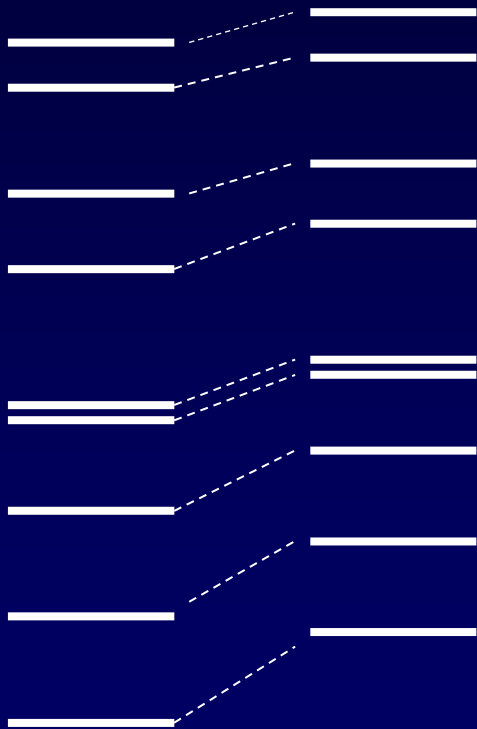
Rescaling:
 None
 Whole gel
 Each track

Spline thickness:

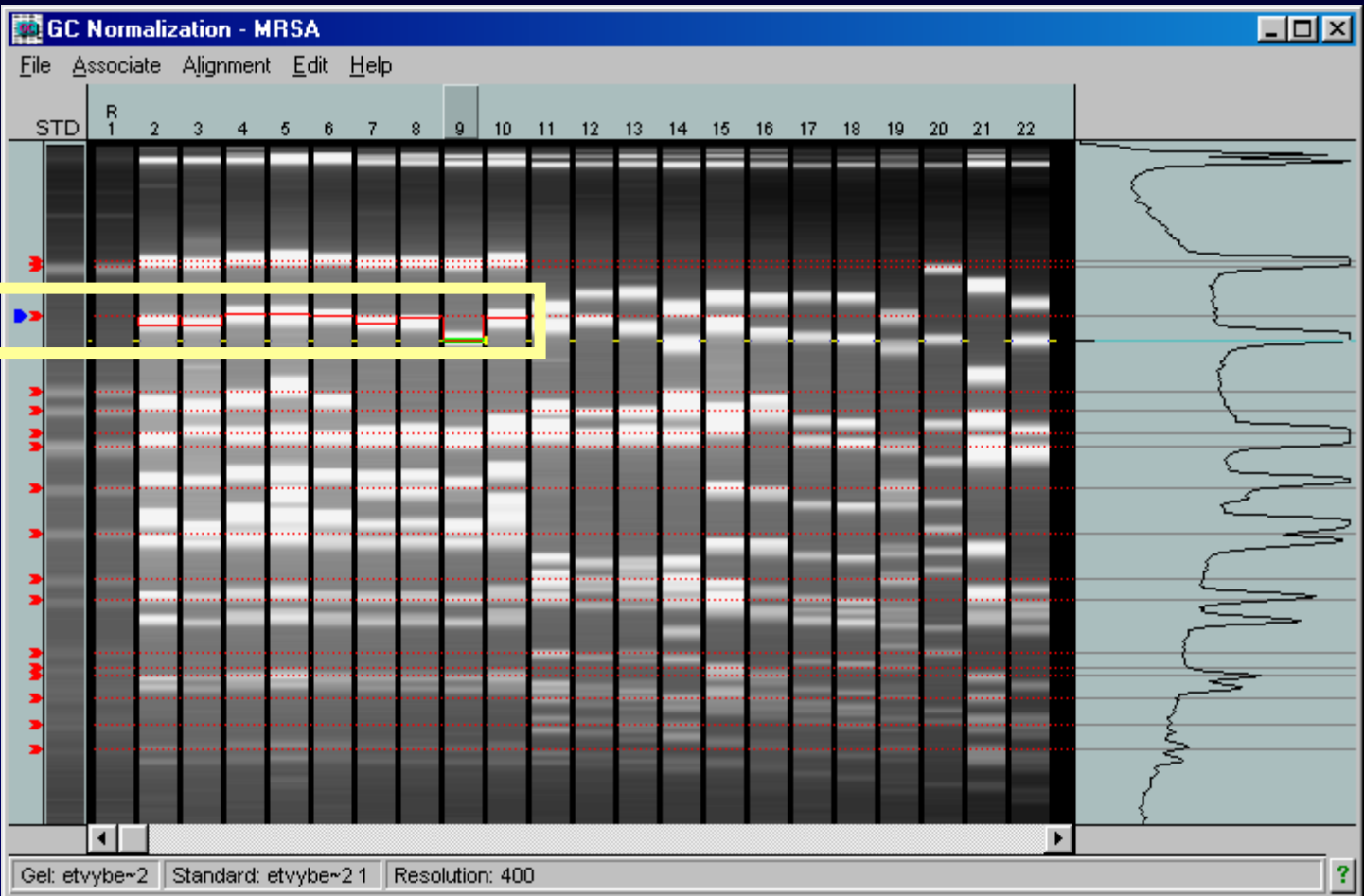
Gelstrip thickness:

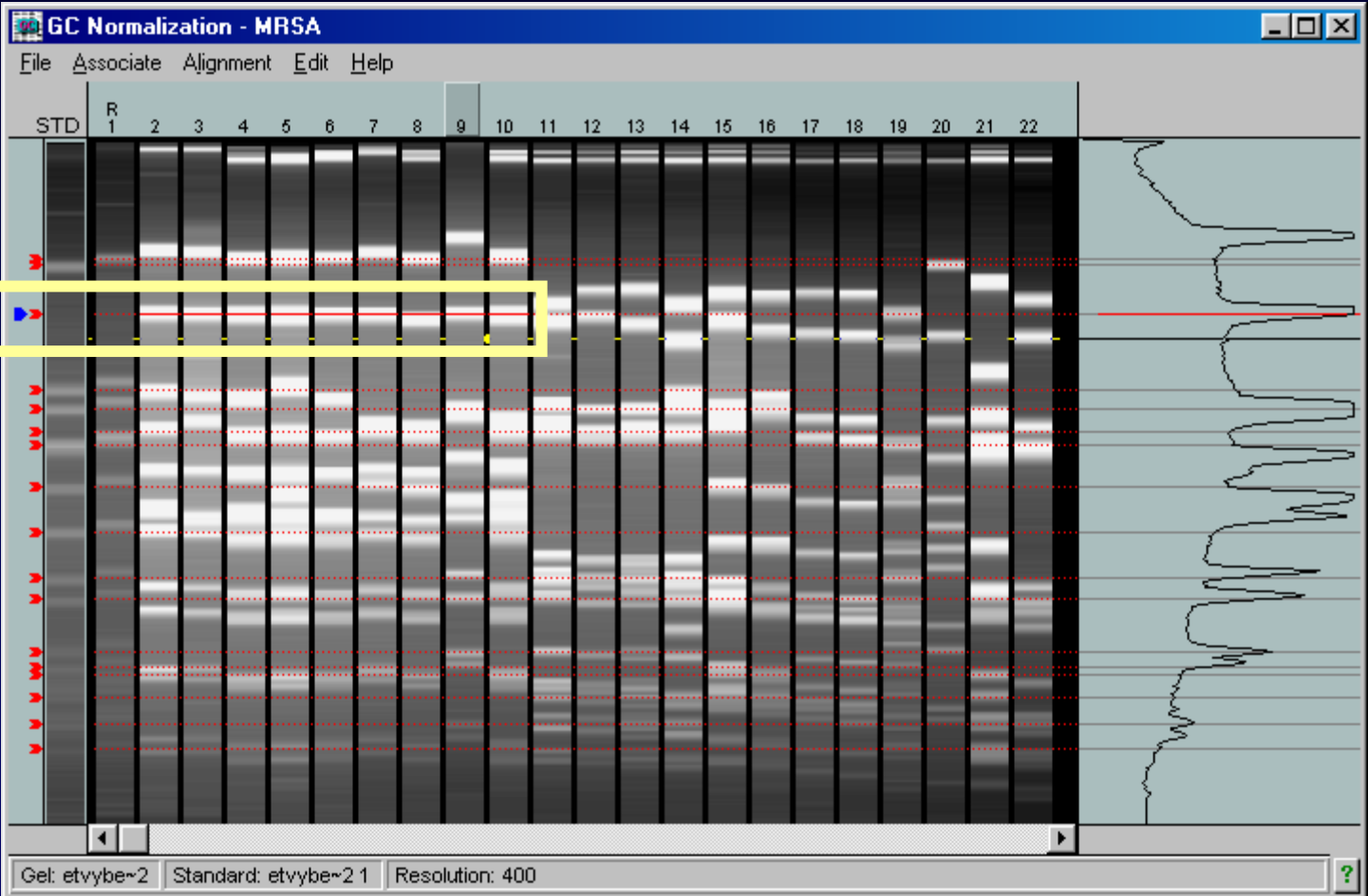
OK Help
 Cancel

Princip normalizace vzorů

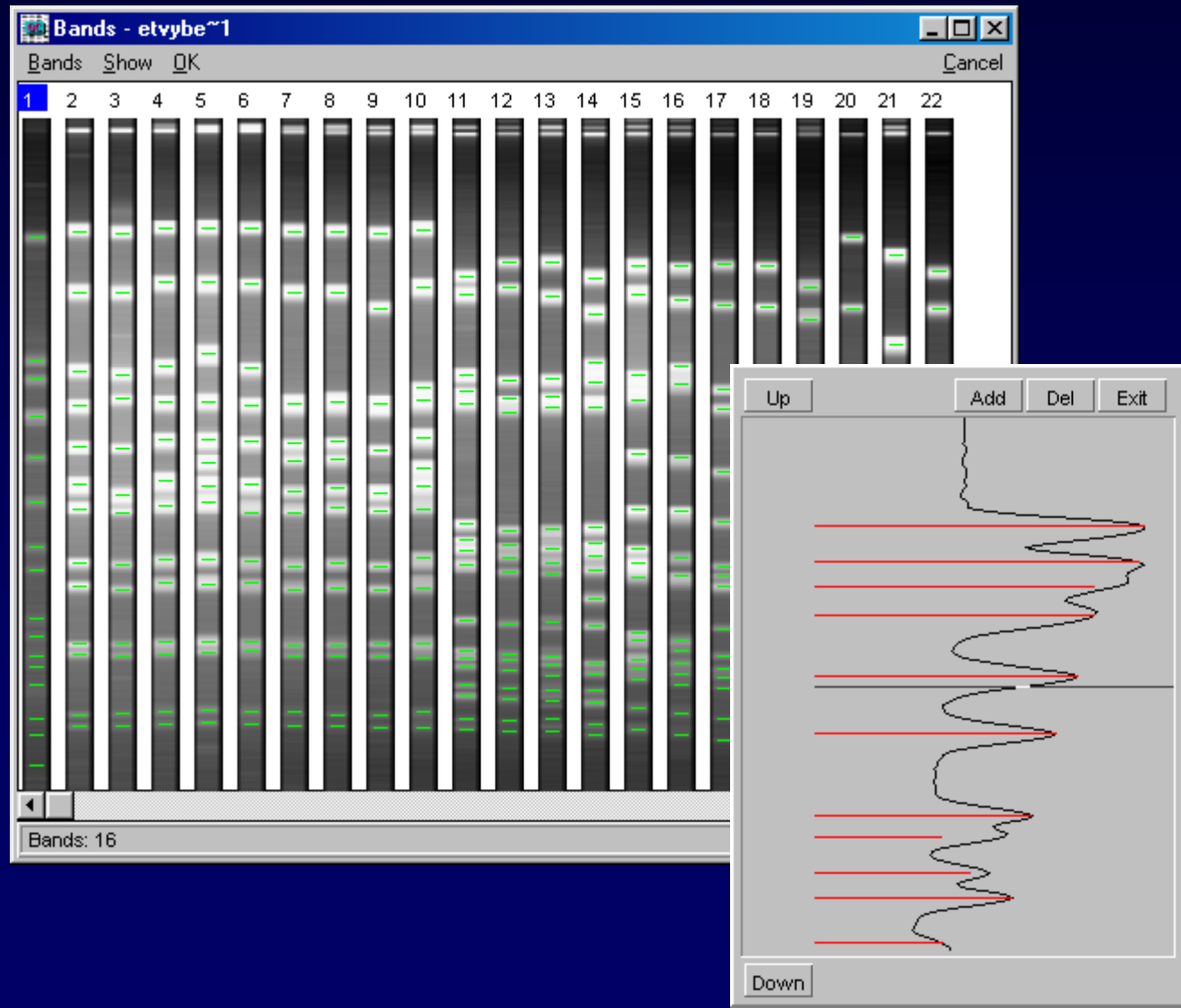


Referenční vzor – přítomný v každé 6. dráze gelu

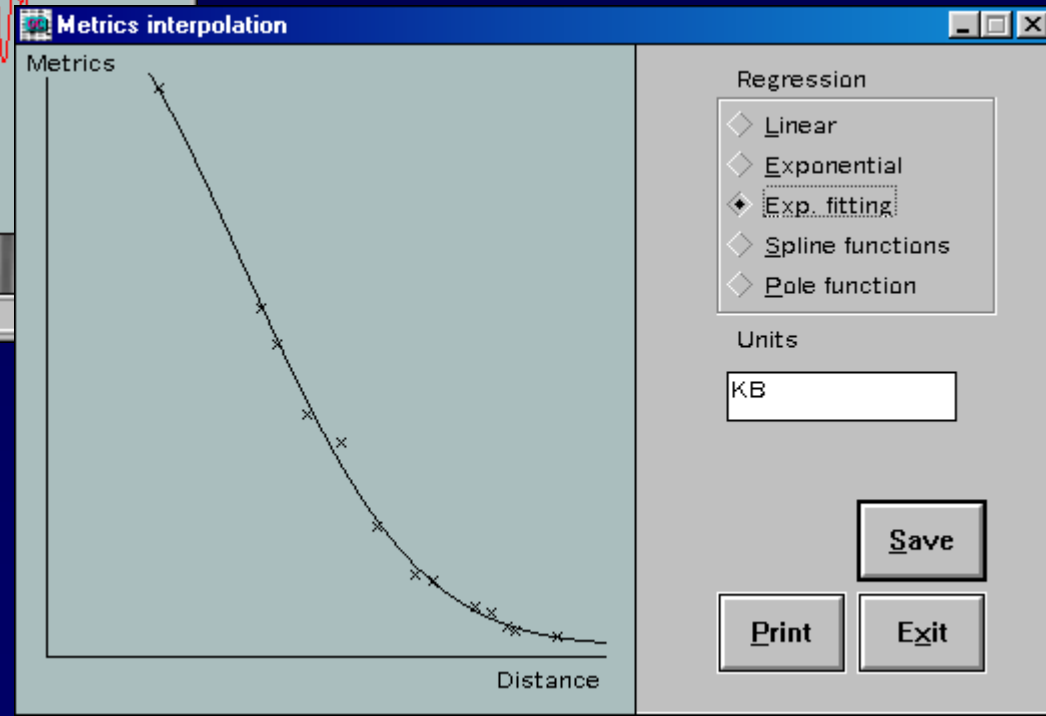
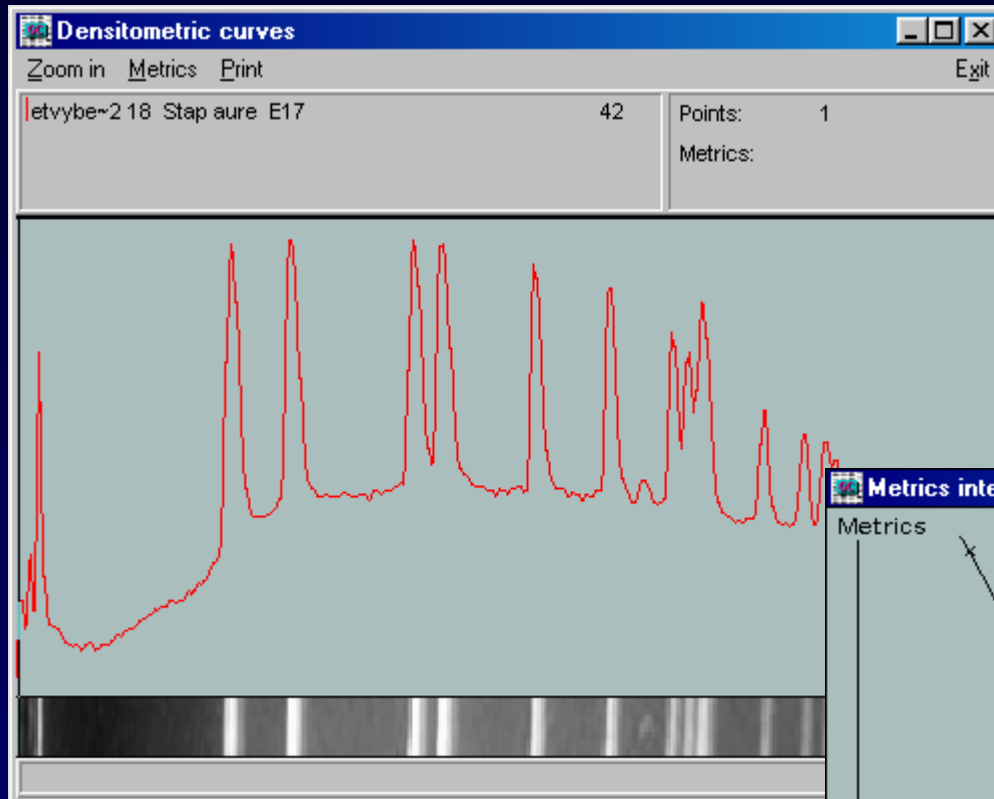




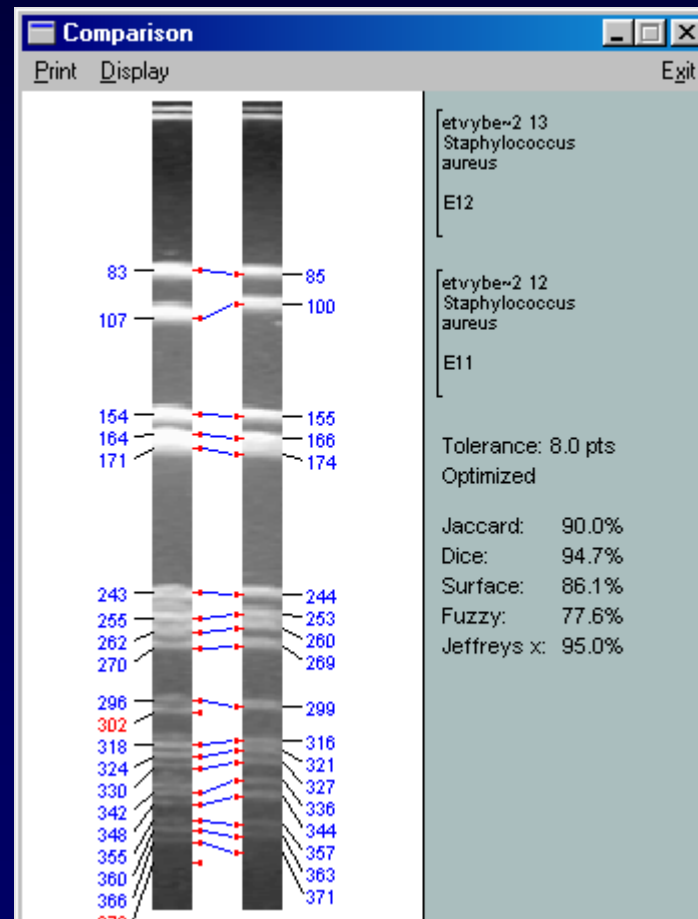
Bands – automatická identifikace pruhů na gelu



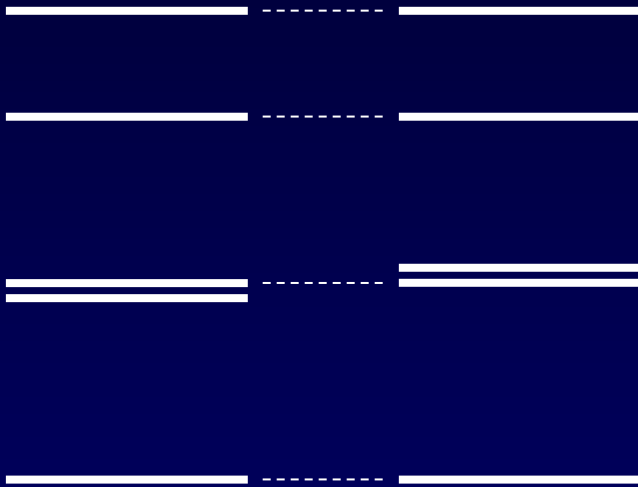
Denzitometrické křivky



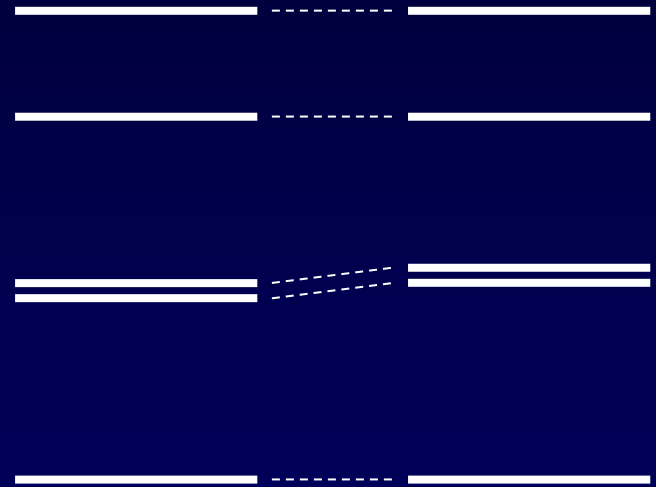
Výpočet koeficientu podobnosti



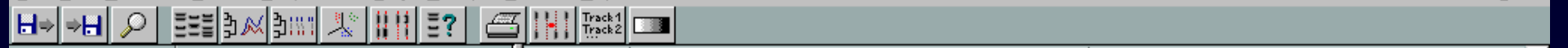
Optimalizace rozpoznávání vzoru



bez optimalizace



s optimalizací



ETV...
ETV...
MRS...
OPIC...
PFMF...
PFZM...
<==...
- [F]...
- [E]...
- [D]...
- [C]...
- [B]...
- [A]

8325
492/98
435/98
99/49
191/01
620/01
459/03
063/04
534/98
257/01
018/02
538/98
439/98
106/02
596/03
021/04
585/03
130/04
885
237/03

Grouping Analysis

Coefficient:

- Jaccard
- Dice
- Area
- Fuzzy logic
- Jeffreys χ coefficient

Clustering method:

- UPGMA
- Ward
- NJ

Optimization

etvybe~1

File	Gel	Track	Exit
→1R		8325	
→2		492/98	
3		618/01	
4		424/02	
→5		435/98	
→6		99/49	
→7		191/01	
→8		620/01	
→9		459/03	
→10		063/04	
→11		534/98	
→12		257/01	
→13		018/02	
→14		538/98	
→15		439/98	
→16		106/02	
→17		596/03	
→18		021/04	
→19		585/03	
→20		130/04	
→21R		885	
→22		237/03	

C:\GCW41\MRSA\GELS.INT\ETVYBE~1.INT Standard: mrsako~1 1 Resol.: 400 ?

Band settings

Band search filters:

Minimal profiling (%)

Minimal area (%)

Shoulder sensitivity 7

Nonlinear fit

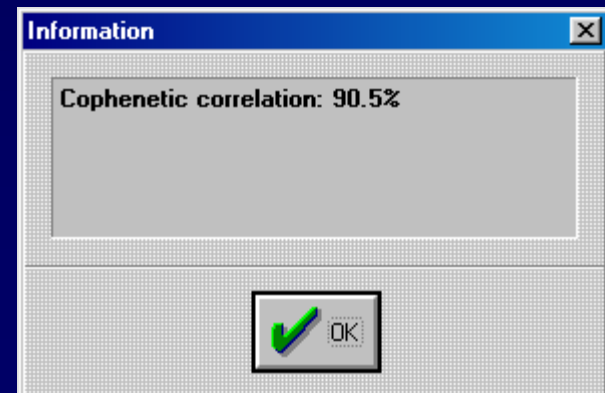
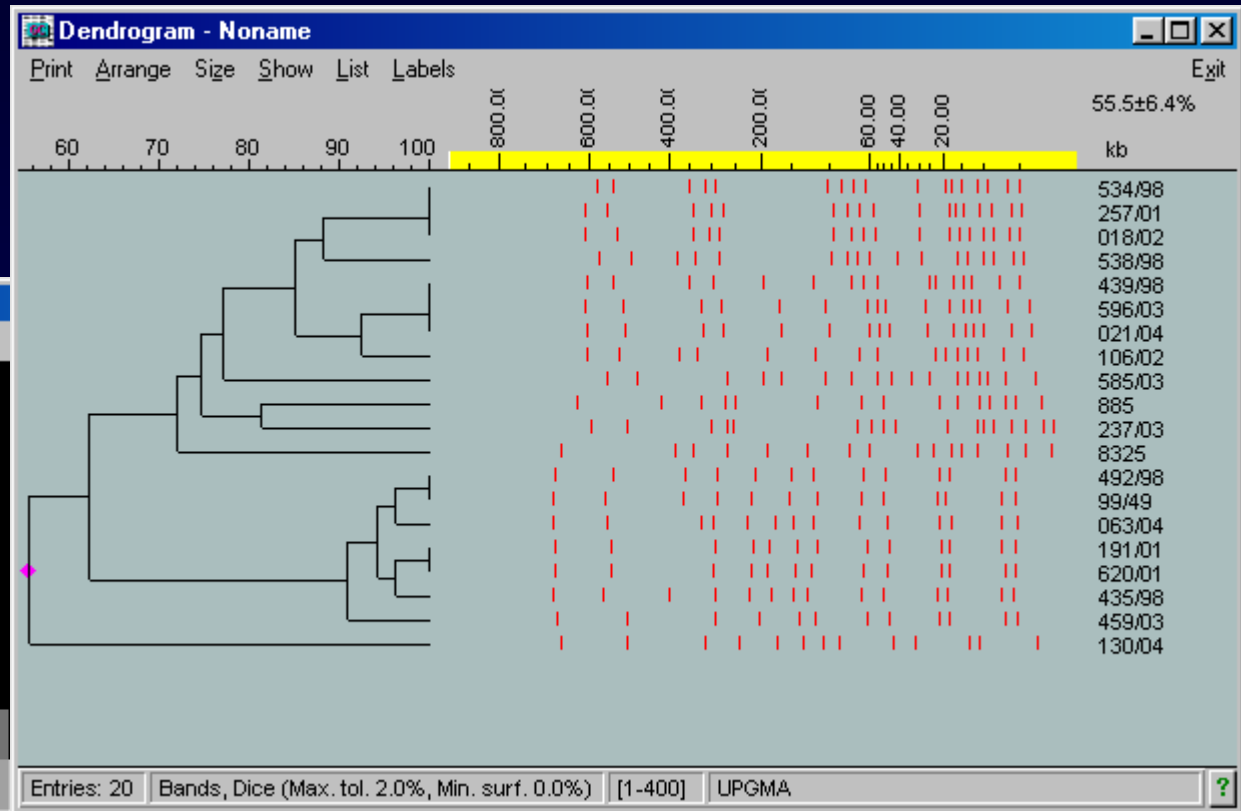
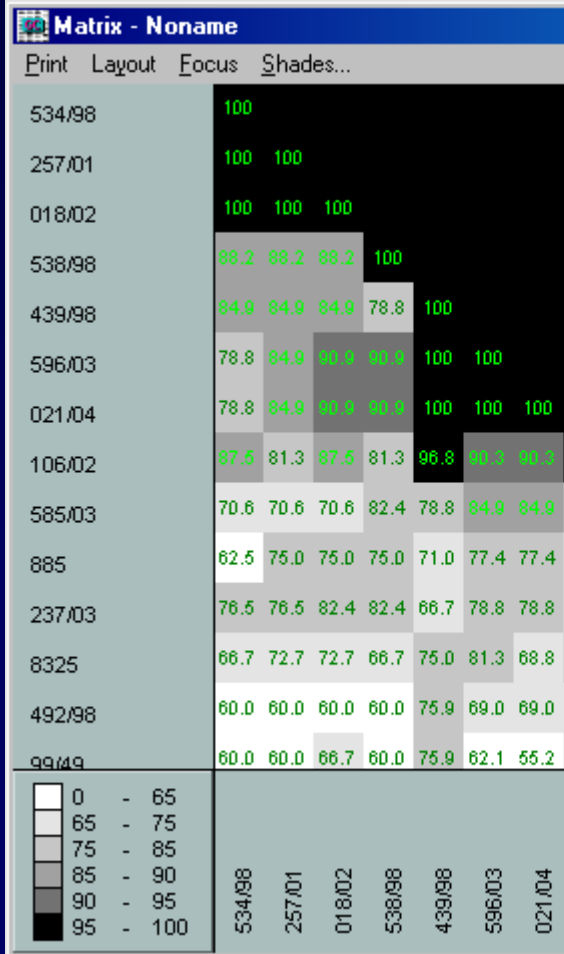
Band comparison settings

Position tolerance (%)

increase (%)

Minimal area (%)

Shluková analýza

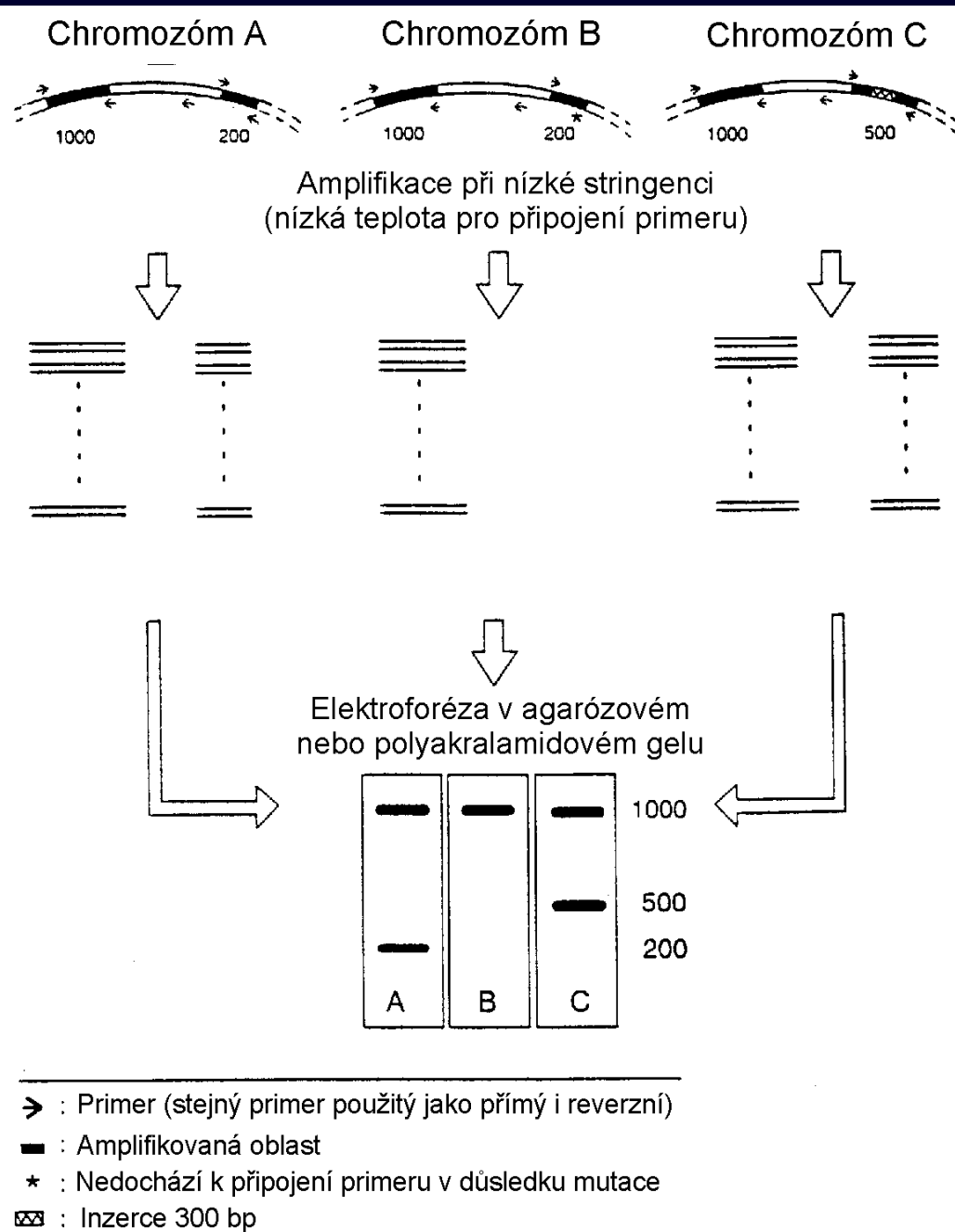
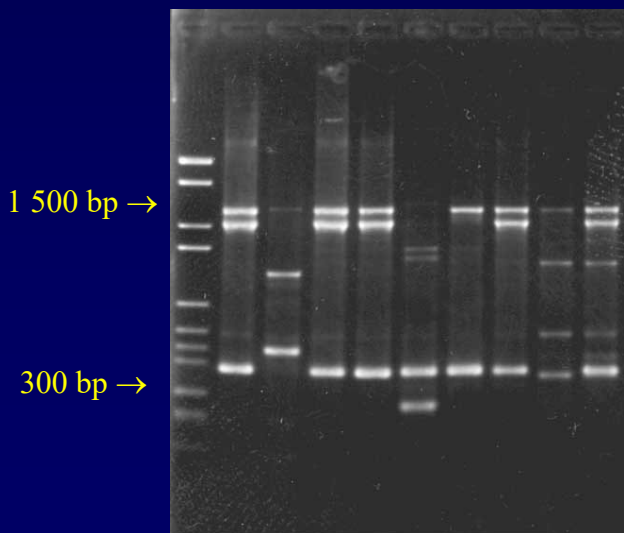


Náhodně amplifikovaná DNA

- Náhodná amplifikace využívající jeden nebo více primerů s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA
- Vzniká více ampliconů s různou velikostí a rozdílným molárním množstvím, nevyžaduje se proto štěpení restrikcními endonukleázami
- Úspěšná, rychlá a jednoduchá technika pro DNA fingerprinting popsaná nezávisle pod různými označeními:
 - AP-PCR (arbitrarily primed PCR fingerprinting)
 - RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)
 - DAF (DNA-amplified fingerprinting)
 - MAAP (multiple arbitrary amplicon profiling)
 - PCR-mediated genotyping
- Princip metody:
 - Metoda používá obvykle jeden krátký primer (8 - 10 bp nebo M13).
 - Teplota pro připojení primeru je mnohem nižší než teoretická hodnota T_a .
 - Za těchto podmínek dochází k nasedání primeru s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích chromozomální nebo plazmidové DNA.
 - Obvykle se vyskytne několik míst pro připojení primeru umožňujících nasednutí primerů 3' konci k sobě, která se vyskytují na protilehlých řetězcích, a nejsou od sebe příliš vzdálená.
 - Výsledkem je amplifikace mnoha fragmentů s různou délkou (max. 2000 bp).

Náhodně amplifikovaná DNA (AP- PCR)

Příklad elektroforézy s AP-PCR produkty



Analýza mezerníkových oblastí mezi repeticemi (Interrepetitivní-PCR, Rep-PCR)

- Technika pro analýzu celého chromozómu využívající přítomnosti repetitivních elementů v bakteriálních nebo eukaryotických genomech.
- Princip metody:
 - Amplifikace známé sekvence, vyskytující se v genomu ve více kopiích (repetice, IS elementy, mezerníky, VNTR)
 - Pro získání DNA fingerprintu je třeba kompletní chromozomální DNA podobně jako u AP-PCR, ačkoli jsou amplifikovány pouze malé části chromozómu.
 - Primery jsou navrhovány tak, aby se připojovaly přímo ke koncovým, konzervativním oblastem repeticí.
 - vzniká více amplikonů o různé velikosti, nevyžaduje se proto štěpení restrikcními endonukleázami
- Nejčastěji je interrepetitivní PCR používána u prokaryot:
- Je třeba navrhnou konsenzní sekvenci primeru a zvolit nižší teplotu pro připojení. 3' konce primeru směřují směrem k mezerníkovým oblastem tak, aby se neamplifikovala samotná repetice.
- Jelikož se mezerníkové oblasti mezi repeticemi liší svou délkou, při amplifikaci vzniká směs různě dlouhých amplikonů (fragmentů DNA), které dávají jedinečný fingerprint
- V závislosti na zvolené repetici je možné získat specifický fingerprint pro druhy (tRNA-interrepetitivní PCR) nebo kmeny (ERIC, REP, BOX a IS6110 interrepetitivní PCR).

TYPY REPETICÍ V PROKARYOTICKÝCH GENOMECH

A. Polynukleotidové sekvence a tandemové repetice

- **Trinukleotid TGG** – nejčastější trinukleotid *E. coli* (součást penta nebo oktanukleotidů).
- **Nonamer AAGTGCGGT** (uptake signal sequence –USS) *H. influenzae* - 1465 kopií.
- **Tandemově opakované polynukleotidové sekvence (GTG)_n nebo (GCC)_n** - vysoce repetitivní u *E. coli*, *S. typhimurium* a *Shigella* sp.
- **Short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences** - heptanukleotidová opakování u sinice *Calothrix*.
- **Major polymorphic tandem repeat (MPTR)** - polymorfní 10-bp DR u *Mycobacterium tuberculosis* a dalších mykobakterií.

B. Krátké roztroušené repetitivní sekvence (kratší než 50 bp)

- **REP (repetitivní extragenové palindromatické sekvence)** 33-40 bp, obrácené repetice typu palindromů; 500 - 1000 REP u *E. coli*.
- **PU (palindromic units)** u *E. coli* a *S. typhimurium*.
- **Mnohokopiový 26-mer (nGREP)** u *Neisseria* sp.
- **Mnohokopiový 24-mer DR element** u *Mycobacterium bovis* (38 kopií).

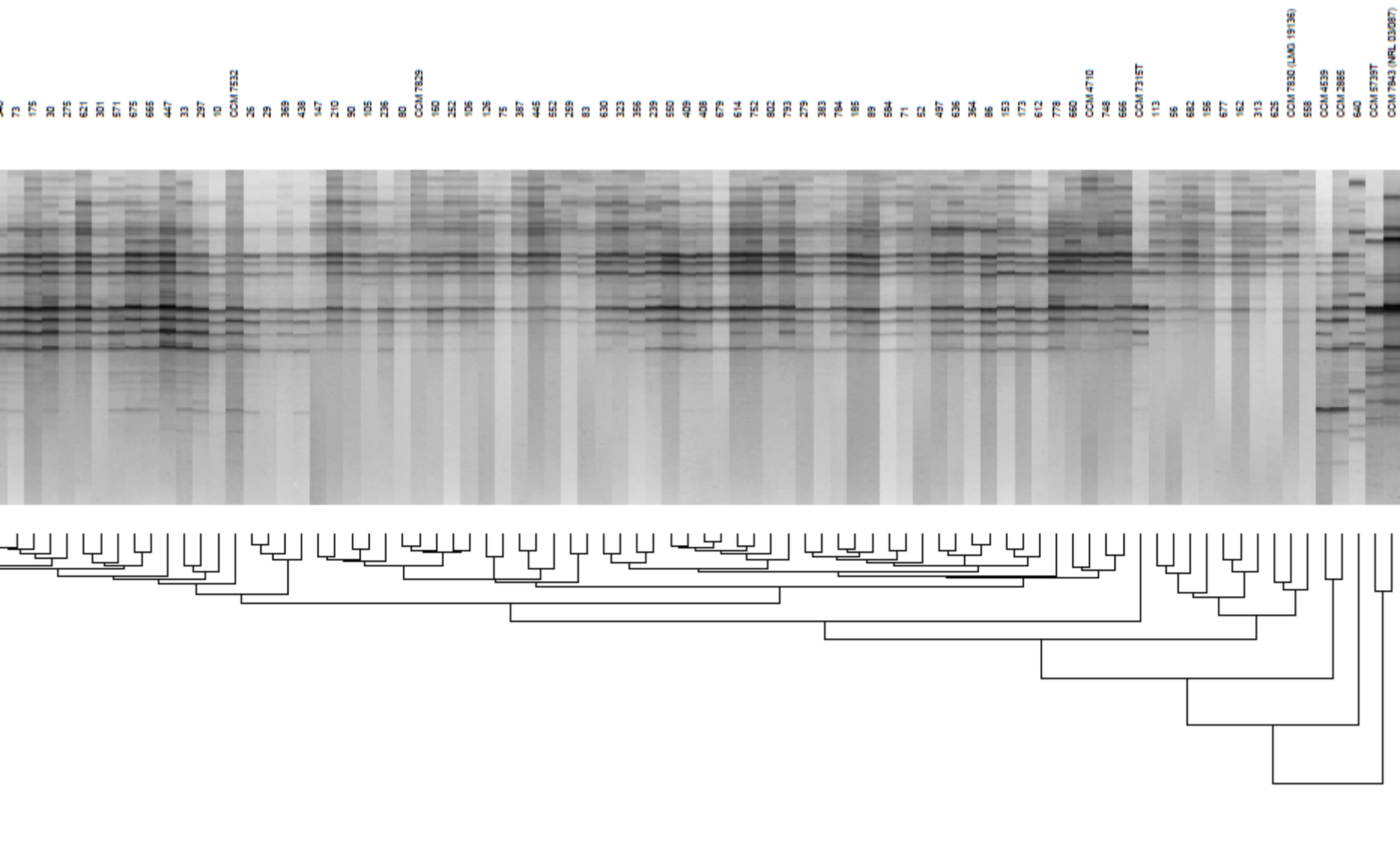
C. Dlouhé roztroušené repetitivní elementy (větší než 50 bp)

- **Intergenic repeat unit (IRU)**
- **Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)** 124-127 bp nebo zkrácené formy. Chromozomová lokalizace se liší u kmenů a druhů. ERIC-like sekvence přítomné v 30 – 150 kopiích v celé bakteriální říši.
- **RLEP (545 - 1063 bp)** u *Mycoplasma leprae* 28 (0,6% genomu).
- **Mx-REP** u *Myxococcus xanthus* - 87 pb jádrová sekvence.
- **Dr-REP (SARK)** u *Deinococcus radidurans*. Element o variabilní délce (150-192 bp).
- **RepMP1-2, SDC1** (150 bp – 1 kb) u *Mycoplasma pneumoniae*, v genomu 8-10 kopií.
- **RepMP2-like** u *Staphylococcus*

D. Mosaikové repetitivní elementy

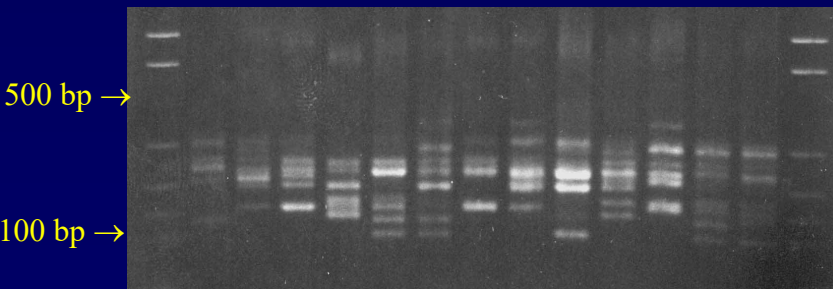
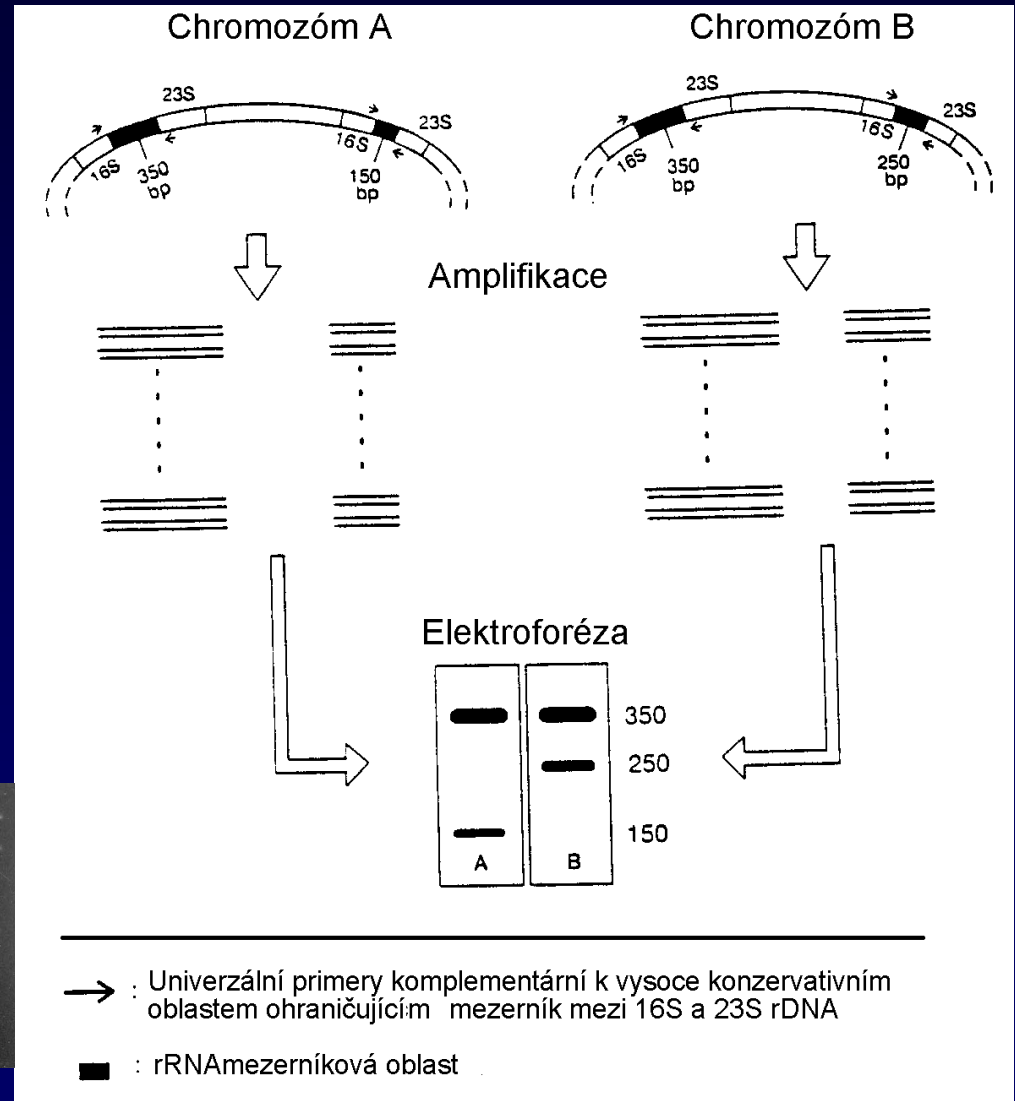
- **Bacterial Interspersed Mosaic Elements (BIME)** – (kombinace REP a sedmi dalších repetitivních motivů).
- **REP MP** - 1 300 bp element ohraničený kratšími repetitivními sekvencemi u *M. pneumoniae*.
- **BOX elementy** – 154 bp rozptýlené repetitivní elementy přítomné v 25 kopiích u G+ (*Streptococcus pneumoniae*).

Příklad gelu s produkty rep-PCR (GTG)₅



Analýza mezerníkových oblastí v rDNA (RS-PCR, PCR-ribotypizace)

- U prokaryot obsahují rDNA operony geny pro všechny tři typy rRNA (16S, 23S a 5S).
- Geny pro 16S a 23S rRNA jsou odděleny mezerníkovou oblastí, která se liší délkou v závislosti na druhu (od 278 bp u mykobakterií do 2 kb u borrelií). Navíc u většiny Eubakterií se vyskytuje více kopií rDNA operonu, u nichž se vyskytují menší rozdíly v délce mezerníků.



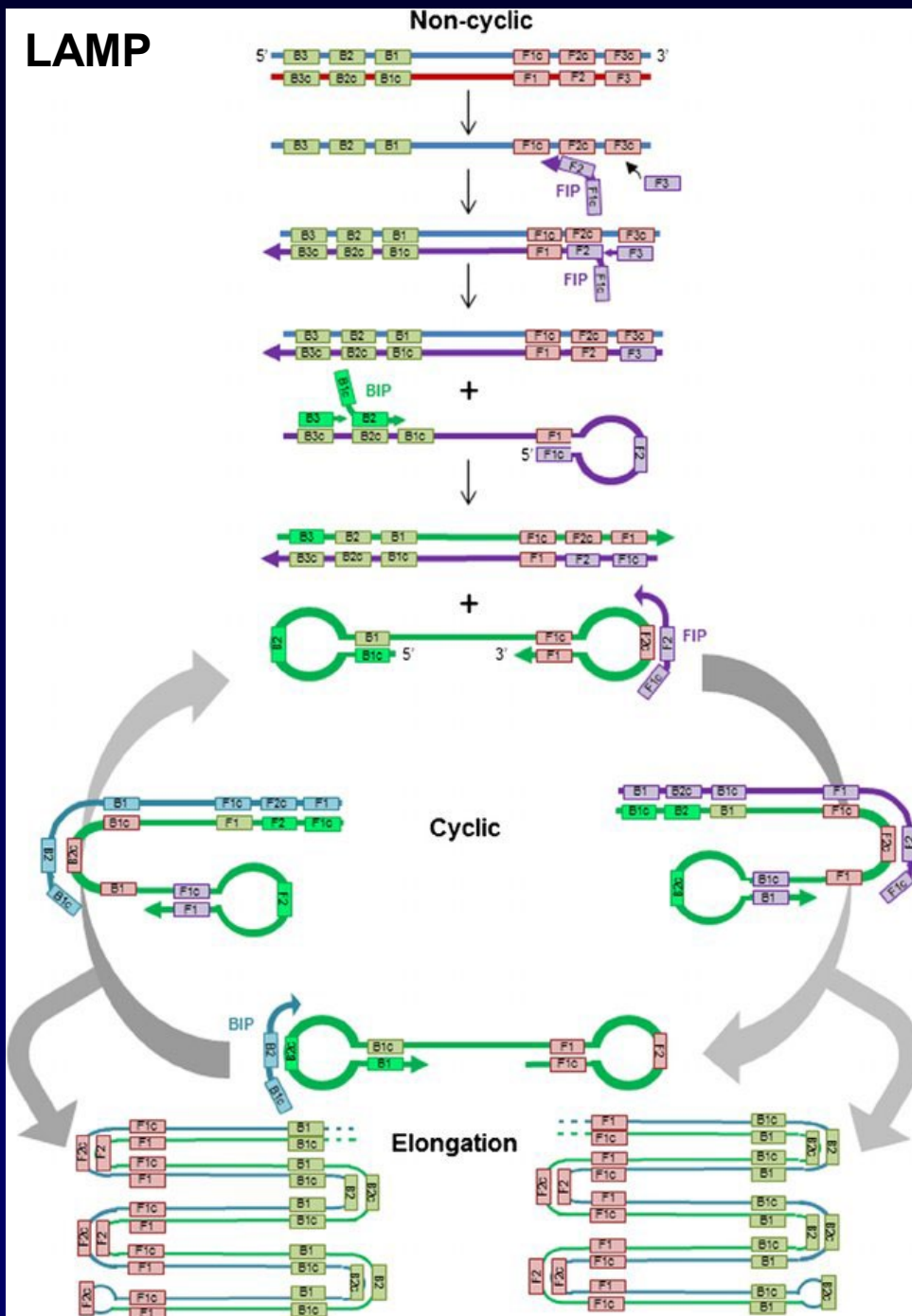
U *Staphylococcus aureus* se nachází v genomu 6 *rrn* operonů, všech 6 mezerníků mezi 16S a 23S rRNA se může lišit svou délkou.

Detekční **amplifikační** metody nevyužívající PCR

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

- Amplifikace za izotermických podmínek s vysokou specificitou a rychlostí
- Metoda využívá DNA polymerázu vytěsňující řetězec (Bsm, Bst) a sadu čtyř primerů
- Primery rozpoznávají celkem šest odlišných sekvencí na cílové DNA
- LAMP iniciuje vnitřní primer obsahující cílové sense a antisense sekvence
- Následující syntéza s vnějším primerem vytěsňuje jednořetězcovou DNA
- Ta slouží jako templát pro syntézu DNA vnitřními a vnějšími primery, které hybridizují s druhým koncem, což vede k vytvoření smyčky
- Při následném cyklu LAMP hybridizuje jeden vnitřní primer se smyčkou a iniciuje syntézu vytěsňené DNA, čímž se získá původní DNA ve smyčce a nová DNA dvojnásobné délky
- Cyklická reakce pokračuje s akumulací 10^9 kopií cíle za méně než hodinu.
- Konečným produktem jsou DNA s několika obrácenými repeticemi a strukturou podobnou kvěťáku s mnoha smyčkami
- Dna lze detekovat/kvantifikovat vhodným fluorescenčním barvivem

LAMP



- Vnitřní primer FIP hybridizuje s F2c v cílové DNA a iniciuje syntézu komplementárních řetězců
- Vnější primer F3, který je o několik bází kratší a nižší v koncentraci než FIP, pomalu hybridizuje s F3c v cílové DNA a iniciuje syntézu vytěsnění řetězce DNA a uvolňuje komplementární vlákno spojené s FIP, které může na jednom konci tvořit smyčkovou strukturu
- Tato jednořetězcová DNA slouží jako templát pro syntézu DNA iniciované BIP a následnou syntézu DNA s přemístěním řetězce s primem B3
- Výsledkem je „dumb-bell“ forma DNA, která se rychle amplifikuje v cyklické části reakce kdy vznikají jak původní kopie, tak násobně prodloužené formy