



Uplatněná certifikovaná metodika MRS 2
(typ výsledků „N“ – Uplatněná certifikovaná metodika)

**Identifikace kmenů MRSA nesoucích gen *mecC* s využitím metody
real-time PCR**

Zpracoval dne 26. 8. 2016

Mgr. Ivan Manga, Ph.D., doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D., Agritec Plant Research s.r.o.

I Cíl uplatnění certifikované metodiky	3
II Vlastní popis metodiky	3
1) Úvod	3
2) Odběr biologického materiálu a mikrobiologická identifikace MRSA.....	5
3) Původ kmenů, použitých pro vývoj a validaci metody qPCR	6
4) Izolace DNA	6
5) Uchování vzorků izolované DNA	7
6) Metoda qPCR pro identifikaci kmenů MRSA s genem <i>mecC</i>	7
III Zdůvodnění, srovnání novosti postupu.....	23
IV Popis uplatnění Certifikované metodiky	24
V Ekonomické aspekty.....	25
VI Seznam použité související literatury.....	26
VII Seznam publikací, které předcházely metodice.....	30
VIII Ostatní.....	32

I Cíl uplatněné certifikované metodiky

Cílem uplatněné certifikované metodiky je poskytnutí nové, vysoce citlivé a spolehlivé metody na principu qPCR pro identifikaci nové formy patogenních kmenů MRSA ve vzorcích pocházejících z hospodářských zvířat, v návaznosti na podporu produkce zdravých a bezpečných živočišných produktů a výrobků. V centru pozornosti metodiky jsou kmeny MRSA nesoucí tzv. *mecC* gen. Mnohé diagnostické postupy a metody, v současnosti rutinně používané při identifikaci MRSA, mohou při analýze kmenů nesoucích gen *mecC* generovat falešně negativní výsledky (detailní komentář je uveden v celku „Zdůvodnění novosti postupu“). Přítomnost nové formy kmenů MRSA ovšem recentně byla prokázána v mnohých státech Evropy, ve vzorcích animálního i humánního původu. Úkolem metodiky je proto přispět ke zvýšení kvality mikrobiální diagnostiky používané při standardní analýze vzorků hospodářských zvířat (nebo jakýchkoliv jiných vzorků), s cílem zamezení dalšího šíření patogenních kmenů MRSA v jejich nové formě. Vyšší kvalita diagnostiky se v konečném důsledku může projevit v redukci nákladů na léčbu onemocnění zvířat i lidí, které jsou způsobeny kmeny MRSA, nebo při účinnější prevenci vzniku těchto onemocnění.

Metodika prezentuje optimalizovaný návrh qPCR pro detekci genu *mecC* včetně výsledků experimentální validace metody a doporučení pro praktické užívání metody. Doplnění této metody ke qPCR analýze dle Manga a Vyleťelová (2013), pak představuje komplexní metodu identifikace MRSA, zahrnující také novou formu *mecC* MRSA.

Uplatnění a certifikace metodiky proběhlo zavedením všech principů Uplatněné certifikované metodiky platných pro rok 2016.

II Vlastní popis metodiky

Návrh, konstrukce a zpracování postupů předkládané metodiky byly vyvinuty z výsledků vlastního výzkumu a vývoje.

1) Úvod

Kmeny *Staphylococcus aureus* a MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) reprezentují významné patogeny se signifikantním vlivem na bezpečnost potravin, zdraví lidí a zvířat. *S. aureus* patří k nejvýznamnějším mastitidním patogenům skotu. Kolonizuje pokožku a mukózní membrány živých organismů a bývá pravidelně detekován také v jatečném mase a finálních potravinových výrobcích. V důsledku rozsáhlejšího používání antibiotik v rámci veterinární péče o hospodářská zvířata může vznikat nežádoucí selekční tlak. Prostředí farmových zvířat, mléčný a masný průmysl pak může být možným zdrojem pro další šíření kmenů *S. aureus* včetně MRSA. Tzv. LA-MRSA (livestock-associated MRSA) ST398 byly v Evropě hojně identifikovány u živých zvířat a v jatečném mase (van Duijkeren et al., 2007; Vanderhaeghen et al., 2010a, b; Weese a Van Duijkeren, 2010). Dle nových zjištění může být LA-MRSA ST-398 odpovědný za relevantní část kmenů MRSA izolovaných z humánních pacientů v nemocnicích, anebo z lidí pracujících v živočišné výrobě. Tato zjištění indikují, že LA-MRSA může vystupovat jako signifikantní příčina infekcí způsobených MRSA u lidí (Köck et al., 2013). Mechanismy přenosu MRSA mezi zvířaty a lidmi jsou neustále v centru pozornosti široké vědecké komunity. Dispozice vhodné screeningové metody pro detekci MRSA reprezentuje základní nástroj pro efektivní management MRSA a pro zamezení dalšího šíření

MRSA. Tradiční metody detekce MRSA jsou časově náročné, pracné a zahrnují přibližně 3 – 4 dny. Navíc, různé typy komerčně dostupných medií detekujících MRSA vykazují diferentní výsledky (Luteijn *et al.*, 2011). Proto existuje značný zájem odborné veřejnosti na vývoji alternativních, časově a finančně méně náročných, efektivních přístupů detekce MRSA. Spolehlivá a rychlá mikrobiální diagnostika ve veterinářství může pomoci při stanovení optimální medikace a může napomoci k úspěchu léčby, v konečném důsledku tak přispěje k redukci morbidity a mortality zvířat. V současnosti existuje několik přístupů identifikace kmenů MRSA, s různými parametry ve vztahu k reprodukovatelnosti, citlivosti, spolehlivosti, finanční a časové náročnosti. Spolehlivost většiny molekulárních metod aktuálně používaných k identifikaci MRSA byla redukována v důsledku nedávného objevení nové formy genu *mec*. V roce 2011 byl v izolátech MRSA humánního a animálního původu nalezen nový homolog genu *mecA*, označený *mecALGA251* (Garcia-Alvares *et al.*, 2011). Mezinárodní skupina pracující na klasifikaci SCC (Staphylococcal Cassette Chromosome) elementů ho přejmenovala na *mecC* (Ito *et al.*, 2012). Gen *mecC* sdílí pouze 69 % homologie nukleotidů s genem *mecA* a byl nalezen v nově pozorovaném SCC elementu označeném jako SCCmec XI. Aktuálně používané molekulární metody identifikace MRSA nekalkulují s detekcí této formy MRSA. Kromě molekulárních technik selhávají při identifikaci *mecC* MRSA také aglutinační testy. Kmeny vykazují negativní reakce při latex aglutinačním testu na PBP2a. Kultury *mecC* MRSA na agarových plotnách s a bez difuzních disků impregnovaných amoxicilinem a kys. klavulanovou indikovaly, že rezistence nebyla zprostředkována hyperprodukcí β -laktamázy (Garcia-Alvarez *et al.*, 2011). Gen β -laktamázy (*blaZ*) je přítomen v SCCmecC, avšak neschopnost kys. klavulanové (inhibitor β -laktamázy) eliminovat tuto rezistenci indikuje, že rezistence pravděpodobně není způsobena β -laktamázou. Nejpravděpodobnějším vysvětlením této rezistence je proto přítomnost *mecA* homologu v SCCmec elementu typu XI (Garcia-Alvarez *et al.*, 2011; Laurent *et al.*, 2012).

Výskyt kmenů MRSA nesoucích gen *mecC* již byl potvrzen prakticky v celé Evropě, u volně žijících zvířat, hospodářských, domácích zvířat i lidí. Dle publikace Paterson *et al.*, (2014) byly kmeny *mecC* MRSA zaznamenány již ve 13 Evropských státech a pocházely ze 14 různých hostitelů. V současnosti tato informace již zcela neplatí a nálezů je více. Názorný přehled recentně zaznamenaného výskytu MRSA s genem *mecC* dle původu kmenů je znázorněn v Tab. 1.

Prezentovaná certifikovaná metodika poskytuje nový přístup detekce genu *mecC* na bázi metody qPCR, která se v uplynulém desetiletí stala standardem sofistikované a spolehlivé mikrobiální diagnostiky.

Tab. 1: Recentní výskyt *mecC* MRSA zaznamenaný v Evropě

Anglie	člověk	Paterson, 2014
	člověk	Paterson, 2013a
	člověk, mléčný skot, tuleň, pes	Paterson, 2013b
	člověk, mléčný skot	Paterson, 2012
	člověk, skot	Garcia-Alvarez, 2011
Belgie	člověk	Deplano, 2014
	člověk, skot	Vandendriessche, 2013
	potkan, králík	Paterson, 2012
Dánsko	ovce, koza	Eriksson, 2013
	člověk, zvířata	Petersen, 2013
	člověk, skot, ovce	Paterson, 2012
	člověk	Stegger, 2012
	člověk, skot	Garcia-Alvarez, 2011
Finsko	mléčný skot	Gindonis, 2013
Francie	člověk	Barraud, 2013
	mléčný skot	Laurent, 2012
Holandsko	mléčný skot	van Duijkeren, 2014
	člověk	Sabat, 2012
Irsko	člověk	Shore, 2011
Německo	člověk, zvířata	Loncaric, 2013
	ovce, pes, kočka, prase	Schaumburg, 2012
	člověk	Kriegeskorte, 2012
	kočka, pes, prase	Walther, 2012
	člověk	Cuny, 2011
Norsko	kočka	Medhus, 2013
Rakousko	člověk	Kerschner, 2014
	skot, divoce žijící zvěř	Loncaric, 2014
	divoká prasata	Loncaric, 2013
Slovinsko	člověk	Dermota, 2015
Španělsko	vysoká zvěř	Gómez, 2015
	člověk	Garcia-Garrote, 2014
	odpadní voda	Porrero, 2014
	hlodavci	Gómez, 2014
Švédsko	mléčný skot	Unnerstad, 2013
	divoká prasata	Monecke, 2013
Švýcarsko	člověk	Basett, 2013

2) Odběr biologického materiálu a mikrobiologická identifikace MRSA

Pro účel metody je možno odebírat bukalní stěry a vzorky mléka hospodářských zvířat, nebo jakékoliv jiné vzorky animálního původu s rizikem výskytu *S. aureus*/MRSA. Cílový organismus *S. aureus* v podobě jeho specifické rezistentní formy již byl detekován v různorodém prostředí (klinické izoláty v nemocničním prostředí, veterinární praxe, prostředí chovu hosp. zvířat, potraviny, prostředkové vzorky, volně žijící zvířata), vstupní biologický

materiál proto může mít různorodý původ, podobu a je determinován konkrétními požadavky uživatele metodiky. Lze odebrat např. humánní, animální stěry, vzorky potravin s potenciální kontaminací *S. aureus* nebo vzorky z přístrojového vybavení používaného v potravinářském průmyslu apod. Vzorky odebíráme pomocí sterilních nástrojů, nebo za pomoci sterilního transportního média (např. Amies médium, Oxoid Ltd., UK).

Mikrobiologická identifikace MRSA sestávala z primární selekce kmenů na Baird-Parker agaru (Oxoid Ltd., USA) a kultivaci 48 h při 37 °C. Suspektní kolonie byly následně kultivovány na krevním agaru (CM 0055, Oxoid) při 37 °C, 24 hod, pro zhodnocení fenotypu a hemolýzy. Další analýzu představoval koagulázový test s lidskou plazmou. Identifikace fenotypu oxacilinové/methicilinové rezistence kmenů MRSA byla provedena na krevním agaru (kultivace 24 h, 37 °C) metodou agarových difúzních disků obsahujících cefoxitin s interpretací dle standardu CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA). Pro konfirmaci druhové identifikace byla použita metoda MALDI MS, výsledky byly srovnány s databází výrobce přístroje (Bruker Daltonics, Inc., USA) a automaticky interpretovány.

3) Původ kmenů, použitých pro vývoj a validaci metody qPCR

Pro vývoj a validaci metody qPCR byly použity kmeny *S. aureus* a MRSA pocházející ze sbírky řešitelů projektu č. QJ1210284, získané z prostředí prvovýroby masa a mléka (zvířata, ošetřující personál). Referenční kmeny *S. aureus* a MRSA pocházely ze sbírky CCM Brno. Referenční a prostředkové kmeny MRSA, nesoucí gen *mecC*, byly poskytnuty s laskavým svolením Dr. P. Ch. Lindemanna z pracoviště Haukeland University Hospital, Oddělení mikrobiologie (Bergen, Norsko).

4) Izolace DNA

Metoda je určená k testování různorodého biologického materiálu s rizikem výskytu *S. aureus* nebo pro testování suspektních kultur *S. aureus* (plotnových, suspenzních). V prvním případě je vhodné aplikovat příslušný plnohodnotný protokol izolace mikrobiální DNA z testovaného biologického vzorku, nejlépe s využitím některého komerčně vyráběného kitu. Suspektní kolonie lze pak testovat různými způsoby zpracování včetně jednoduchých a velice rychlých postupů, a to v závislosti požadavku na citlivost nebo rychlost provedení metody. Metodu lze uskutečnit i s přidáním malého množství kultury přímo do qPCR reakce, zde je ovšem vhodné použít qPCR reakční směs, umožňující robustní a spolehlivou amplifikaci, případně speciální qPCR mastermix umožňující eliminovat vliv přítomných inhibitorů. Metoda v uvedeném formátu může rovněž vykazovat nižší citlivost. Při požadavku na co nejvyšší citlivost a reprodukovatelnost výsledků metody doporučujeme používat protokol izolace DNA fungující na principu některého z komerčně vyráběných kitů, optimalizovaných pro izolaci mikrobiální, nebo genomické DNA.

V našem případě jsme pro izolaci DNA využívali následující protokoly:

A) Izolace DNA ze suspektních kolonií na plotnových kulturách:

Pro izolaci DNA byl použit komerční kit (NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel), využívající kolonkovou metodu. V důsledku možnosti výskytu problémů spojených

s nedostatečnou lýzou buněčné stěny u G+ bakterií byl první krok izolace mírně upraven. Malé množství kultury bylo odebráno bakteriologickým očkem do sterilní 1,5ml zkumavky se 180 µl lyzačního pufru o následovném složení: 20 mM Tris/HCl; 2 mM EDTA; 1% TRITON X-100 (pH 8); pufr byl obohacen o přídavek lysozymu (20 mg/ml). Po inkubaci 30 – 60 min při 37 °C byla ke vzorkům přidána proteináza K (20 mg/ml). Vzorky byly následně inkubovány při 56 °C 1 – 3 hod do kompletní lýzy. Další postup odpovídal standardnímu protokolu s využitím kitu NucleoSpin Tissue, dle pokynu výrobce. Koncentrace a čistota DNA byla měřena na spektrofotometru Tecan (Tecan Group Ltd., Switzerland), hodnoty koncentrace u izolátů získaných výše popsaným postupem dosahovaly hodnoty 100 – 300 ng/µl.

B) Izolace DNA z plotnových kultur varem:

Praktickou alternativou při práci s vyočkovanými kulturami byl rychlý postup izolace DNA, sestávající z následujících kroků: do sterilní, 1,5 ml zkumavky, odebereme bakteriologickým očkem malé množství kultury. Přidáme 250 µl sterilní H₂O, necháme inkubovat 10 min při 100 °C. Vzorek centrifugujeme 2-5 min při 13 – 15 tis. rpm (≥ 12 000 g). Poté odsajeme supernatant v objemu ca 200 µl, který obsahuje eluovanou DNA. Supernatant je možné bez dalších úprav přímo aplikovat do PCR.

Při testování vzorků obsahujících minimální kvantitu cílového patogenu lze využít aditivní kultivaci (tzv. enrichment step) v Baird-Parker tekutém médiu (Oxoid Ltd., USA), selektujícím stafylokoky. Tekuté Baird-Parker médium lze připravit pomocí standardního protokolu, s výjimkou přidání agaru. Testovaný biologický materiál se použije na inokulaci média (např. malý objem mléka dojníc s příznaky klinické nebo subklinické mastitidy) a nechá se inkubovat např. 12 hod při 37 °C, s cílem selektivního pomnožení cílových patogenů. Malý objem suspenzní kultury (1 – 1,5 ml) se po inkubaci transportuje do sterilní zkumavky a centrifuguje 5 min při 10 000 g. Po odstranění supernatantu se ve zkumavce ponechá pelet v objemu ca 25 µl, který se rozpustí ve 180 µl lyzačního pufru s přídávkem lysozymu. Následně je možné pokračovat standardním protokolem izolace s pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel Inc., France).

5) Uchování vzorků izolované DNA

Izoláty DNA určené k bezprostřední analýze, nebo izoláty s plánovanou testací během několika dní uskladňujeme při teplotě 3 – 5 °C. Standardní archivace izolátů DNA, která je určená k dlouhodobému skladování a k opakované analýze vzorků ovšem počítá se zamražením na –30 °C, případně –80 °C.

6) Metoda qPCR pro identifikaci kmenů MRSA s genem *mecC*

6.1 Návrh metody

Výchozí metodou na principu qPCR pro identifikaci *S. aureus* a MRSA byly metody autora publikované v minulosti. Metoda popsaná v publikaci Manga a Vyletěllová (2013) je postavená na qPCR identifikaci specifické sekvence genu *nuc* jako markera pro identifikaci *S. aureus* a na identifikaci sekvence genu *mecA*, umožňující identifikaci methicilinové/oxacilinové rezistence. Technologicky se jedná o platformu qPCR využívající

fluorescenčně značené sondy. Komplet obou metod, vykonávaných paralelně při identickém teplotním a časovém programu PCR, pak umožňuje spolehlivou identifikaci kmenů MRSA. Metodika Manga (2011), byla zkonstruována za účelem identifikace a kvantifikace *S. aureus* ve vzorcích mléka hospodářských zvířat. Zde se jedná o platformu qPCR fungující na bázi nespecifického barviva SYBR green. Nově prezentovaná metodika qPCR identifikace MRSA nesoucích *mecC* gen byla navržena jako evoluce, v resp. doplnění těchto již publikovaných metod.

Pro specifickou identifikaci nové formy genu *mecA*, poprvé popsáno v roce 2011 a označeného jako *mecC*, byla vybrána odpovídající referenční sekvence (FR821779.1), uložená v databázi Genbank. Prvním krokem bylo ověření konzervativnosti sekvencí genu *mecC* zveřejněných v publikovaných studiích a sekvencí uložených v dostupných databázích s využitím programu BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov). Srovnání všech dostupných sekvencí genu *mecC* odhalilo 100% identitu sekvence a poukázalo tak na vysokou konzervovanost a konstantnost primární struktury genu *mecC*. Uvedená skutečnost byla pozitivem pro samotný návrh primerů a sondy pro qPCR, jelikož z důvodu absence SNPs nevznikala omezení pro umístění oligonukleotidů. Pro design primerů a sondy byl použit program eprimer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), primery byly navrženy s požadavkem na optimální teplotu annealingu ca 60 °C. Zohledněna byla také jejich délka, absence dlouhých repeticí a energie vazeb nežádoucích struktur jako jsou diméry primerů nebo tzv. vlásenka. Sonda byla navržena identickým programem, důležitým požadavkem zde byla T_m (teplota denaturace) vyšší přibližně o 10 °C ve srovnání s T_m primerů. Kromě požadavku na nízkou stabilitu případných nežádoucích struktur a dalších zmiňovaných parametrů byla sonda navržena tak, aby její délka nepřesáhla 32 nukleotidů. Vyšší délka sondy by mohla mít negativní vliv na intenzitu generovaného fluorescenčního signálu, jelikož interakce mezi fluorescenčním reportérem na 5' konci a zhášedčem na 3' konci by nebyla ideální. Sonda byla volena tak, aby v dané sekvenci při alternativě templátu přímého a zpětného vlákna obsahovala méně guaninů a více cytosinů. Jako fluorescenční reportér na 5' konci sondy byl vybrán FAM v kombinaci s nefluorescenčním a účinným zhášedčem BHQ1 na 3' konci sondy. Specifita všech navržených oligonukleotidů byla testována in silico s pomocí aplikace BLAST, výsledky diagnostikovaly návrh plně spolehlivých a specifických sekvencí, bez možnosti získání falešně pozitivních výsledků. Návrh metodiky zohlednil také požadavek na menší velikost PCR produktu (100 – 150 bp), což je rovněž standardem u komerčně dostupných qPCR metodik. Cílem je rychlá amplifikace a eliminace nespecifických PCR produktů. Krátký PCR produkt umožňuje používání programu rychlé amplifikace v krátkém časovém intervalu, což eliminuje tvorbu nespecifických PCR produktů. Lokalizace primerů a sondy v ref. sekvenci *mecC* je znázorněna na Obr. 1.

Obr. 1: Lokalizace navržených primerů a sondy v použité referenční sekvenci genu *mecC*:

GenBank: FR821779.1

```
>gi|344176319:35681-37678 Staphylococcus aureus subsp. aureus LGA251
complete genome sequence
ATGAAAAAATTTATATTAGTGTGCTAGTTCCTTTTACTAATTATGATTATAATAACTTGGTTATTCAAAGATGAC
GATATTGAGAAAACAATTAGTTCCTATTGAAAAAGGAAACTATAACGAAGTATATAAAAAATAGTTCAGAAAAATCT
AAACTGGCATATGGAGAAGAAGAAATTGTAGATAGGAATAAAAAAATTTACAAAAGATTTAAGTGTCATAACTTA
AAAATTACTAATCATGAAATTAAAAAAACTGGAAAAAGATAAAAAAGCAAGTTGATGTTAAAATATAACATATATACA
AAATATGGAACTATACGACGTAATACACAATTAAACTTTATTTATGAAGATAAGCATTGGAAATTAGATTGGAGA
CCAGACGTAATAGTACCTGGTTTGGAAAAATGGACAGAAAATTAATATAGAAAACATTAATAATCAGAGCGAGGCAAA
ATAAAAGATAGAAATGGTATAGAATTAGCTAAAACCTGGAAATACATATGAAATCGGTATTGTCCCTAACAAAAACA
CCCAAAGAAAAATATGATGATATTGCTCGTGACTTACAAATTGATACAAAAGCTATAACCAATAAAGTTAATCAA
AAATGGGTTTCAGCCAGATTCATTTGTACCAATTA AAAAGATAAATAAACAAGATGAATATATAGACAAATTAATT
AAATCATACAATTTACAAATAAACACTATAAAAAAGCCGTGTTTATCCATTGAACGAAGCAACAGTACACCTTTTA
GGTTATGTGGGTCCAATTAATTCTGACGAGTTAAAAAGTAAGCAATTTAGAAACTATAGCAAAAAACTGTTATT
GGAAAAAAGGCTTAGAACGCCTCTATGATAAAACAATTGCAAAAACACTGATGGTTTTAAGGTATCCATTGCAAAAT
ACTTATGACAATAAACCTTTAGACACATTATTGGAGAAAAAGGCTGAAAACGGAAAAAGATCTTCATTTAACTATA
GATGCTAGAGTACAAGAAAGTATTTATAAACATATGAAAAATGACGATGGATCTGGTACAGCATTACAACCAAAA
ACTGGAGAAATTTTAGCTTTGGTAAGTACCCCATCGTACGATGTTTATCCATTCATGAATGGATTAAGCAATAAT
GACTACCGTAAATTAACATAACAATAAAAAAGAGCCTTTGCTCAACAAATTTCAAATCACTACATCACCAGGTTCA
ACCAAAAAATATTAACATCTATTATAGCCTTAAAAGAAAATAAACTAGACAAAAATACTAATTTTGATATTTAT
GGTAAGGGTTGGCAAAAAGATGCATCATGGGGGAATTATAATATCACAAAGATTTAAAGTAGTAGACGCGCAATATC
GATTTAAAGCAAGCAATAGAATCATCAGACAACATATTTTTTGCCCCGATTGCATTAGCATTAGGAGCCAAAAAA
TTTGAGCAAGGTATGC AAGATTTGGGAATCGGTGAAAATATCCCGAGTGATTATCCCTTTTATAAAGCACAAATC
TCAAATAGTAATTTAAAAAATGAAATATTATTAGCAGATTCAGGATATGGCCAAGGCGAGATACTAGTAAACCCCT
ATACAAATTTTATCAATATACAGTGCTTTAGAAAATAACGGAAATATACAAAAATCCTCATGTTTTACGTAAAAACA
AAATCTCAAATATGAAAAAAGATATTATACCTAAAAAAGACATAGATATATTAACATAATGGTATGGAACGTGTA
GTTAATAAAACACATAGGGATGATATATACAAAAATTATGCCGAATTATTGGTAAATCTGGCACAGCAGAAATTA
AAAATGAATCAAGGGGAAACTGGAAGACAAATAGGTTGGTTTGTTCATATAATAAAAAATAATCCTAATATGTTA
ATGGCGATTAATGTTAAAGACGTTCAAATAAAGGGATGGCCAGCTATAATGCTACTATATCTGAAAAAGTTTAT
GATGATTTGTATGATAATGAAAAACTCAATTTGATATAGATCAGTAA
```

6.2 Publikované metody PCR pro gen *mecC*

Na základě parametrů primerů v některých publikovaných studiích a na základě doporučeného teplotního a časového programu pro PCR při použití daných primerů možno predikovat, že námi prezentovaná metoda představuje robustnější a spolehlivější alternativu, ve variantě se sondou použitelnou také pro spolehlivou kvantifikaci genu *mecC*. Příkladem nedostatků, které indikují možnost problémů při PCR s použitím některých publikovaných primerů, jsou: přítomnost poly-repeticí nukleotidů (přítomné např. v metodice Stegger *et al.*, 2011; Garcia-Alvarez *et al.*, 2011), které mohou negativně ovlivňovat specifitu PCR a také příliš nízká T_m (teplota denaturace) primerů, která může podstatně eliminovat účinnost PCR reakce a komplikuje návrh přijatelného teplotního a časového programu PCR (příkladem jsou PCR dle Cunney *et al.*, (2011); Stegger *et al.*, (2012); Basset *et al.*, (2013). Naopak, jako přijatelné alternativy pro rutinní identifikaci genu *mecC* se jeví metody PCR publikované autory Pichon *et al.*, (2012) a Nijhuis *et al.*, (2014), které byly navrženy také pro formát qPCR. Teoreticky by tak měli vykazovat parametry robustní a spolehlivé PCR.

6.3 Doporučený postup a použité reagensie

Pro specifickou amplifikaci PCR produktu genu *mecC* o velikosti 139 bp byly použity následující oligonukleotidy:

mecC_R 5' - TTTCACCGATTCCCAAATCTT – 3'

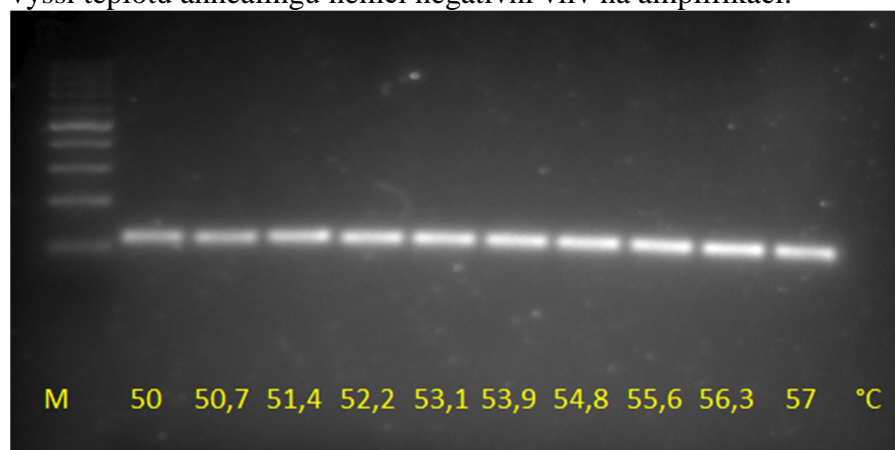
mecC_F 5' - GCAATATCGATTAAAGCAAGCA – 3'

sonda mecC 5' - FAM - CTCCTAATGCTAATGCAATGCGGGCA – BHQ1 – 3'

PCR reakce byla experimentálně ověřena ve formátu SYBR green a rovněž ve formátu využívajícím fluorescenčně značenou sondu (FAM-BHQ1). Optimální teplota annealingu byla stanovena experimentálně při PCR s gradientem annealingu primerů (Obr. 2.). Po stanovení teploty annealingu primerů a definici PCR teplotního a časového profilu qPCR bylo experimentálně optimalizováno PCR reakční složení. Teplotní a časový profil obou qPCR je uveden v Tab. 2A, 2B. qPCR ve formátu SYBR green byla doplněna analýzou křivky denaturace vzniknutého PCR produktu, která může poskytnout kontrolní doplňující informaci o specifitě amplifikovaného PCR produktu (Tab. 2C). qPCR využívající SYBR green byla prováděna v objemu 20 µl s použitím 2 x SYBR green master mixu (BioRad Ltd., CA, USA), obsahujícího *Taq* polymerázu typu „Hot star“, sloužící k eliminaci tvorby nespecifických produktů, dále s 400 nM koncentrací obou primerů, různorodou koncentrací templátové DNA v objemu 1 µl a ultra čistou PCR vodou. qPCR využívající fluorescenčně značenou sondu měla podobné složení: 2 x SsoFast™ Probes Supermix (BioRad Ltd., CA, USA), 400 nM obou primerů, 200 nM sondy, templátovou DNA v objemu např. 1 µl a ultra čistou PCR vodu. Metody qPCR v použitém schématu (teplotní a časový profil, složení reakční směsi) umožňují testování izolátů různorodé kvality bez nutnosti realizací dalších modifikací metod.

Porovnání fluorescence ve vzorcích na destičce po skončení qPCR s bazální fluorescencí, měřenou na začátku qPCR, umožňuje identifikaci pozitivních/negativních výsledků testace přítomnosti genu *mecC*. Vzorky s hodnotami $C_p \leq 40$ byly identifikovány jako pozitivní. Při analýzách byla používána negativní kontrola pro kontrolu kontaminace (vzorek s kompletním reakčním složením, avšak bez obsahu templátové DNA) a také pozitivní kontrola (vzorek se standardizovaným reakčním složením obsahující DNA referenčního kmene MRSA s *mecC* genem). qPCR byly realizovány na přístroji Lightcycler 480 (Roche Ltd., USA). Použitím funkce „Genotyping samples“ v software k ovládání přístroje LC480 je možné zadat threshold pro hodnotu C_p , dle které budou automaticky interpretovány výsledky analýzy. Výsledky je pak možné exportovat do excelové tabulky.

Obr. 2: Standardní PCR genu *mecC*, experimentální stanovení optimální teploty annealingu primerů s pomocí funkce teplotního gradientu annealingu primerů (50 – 57 °C). Požadavek na vyšší teplotu annealingu neměl negativní vliv na amplifikaci.



Tab. 2A: Teplotní a časový profil qPCR *mecC* – SYBR green

PCR program SYBR green	úvodní denaturace	denaturace	annealing	elongace	počet cyklů	závěrečná elongace
	95 °C/4 min	94 °C/25 sec	57 °C/30 sec	72 °C/25 sec	45	72 °C/5 min

Tab. 2B: Teplotní a časový profil qPCR *mecC* – FAM-BHQ1

PCR program FAM-BHQ1	úvodní denaturace	denaturace	annealing a elongace	počet cyklů	závěrečná elongace
	95 °C/5 min	94 °C/15 sec	57 °C/60 sec	45	72 °C/5 min

Tab. 2C: Teplotní a časový profil křivky tání (denaturace) PCR produktů (qPCR *mecC* – SYBR green)

melting curve	95 °C/1 min	70 °C/1 min	70–95 °C/ 0,2 °C/10 sec
----------------------	-------------	-------------	-------------------------

6.4 Princip kvantifikace cílové sekvence

Pro kvantifikaci cílové sekvence je využíván přístup tzv. absolutní kvantifikace. Principem kvantifikace je stanovení kvantity cílové sekvence v testovaných vzorcích DNA za pomoci kalibrační křivky, která je vytvořena z referenčního kmene MRSA se známou koncentrací DNA. Při interpretaci výsledků qPCR vycházíme z hodnot C_p . C_p představuje hodnotu, při které fluorescence amplifikovaného PCR produktu překročí hodnotu bazální, tzv. background fluorescence („baseline“), hodnota C_p odpovídá druhé derivaci maxima fluorescence amplifikační křivky. Srovnáním hodnot C_p testovaných vzorků se standardy kalibrační křivky pak můžeme stanovit kvantitu cílové sekvence ve zkoumaném vzorku.

Stanovení hodnot C_p je v software pro ovládání přístroje LC480 při použití metody druhé derivace maxima fluorescence generováno automaticky.

6.5 Validace a testování metody

Validace metody zahrnovala experimentální testování základních vlastností metody, jako je efektivnost amplifikace, limit detekce, reprodukovatelnost, specifita PCR reakce, specifita celkové metody a dynamický rozsah pro kvantitativní experimenty.

Efektivnost amplifikace (E) byla stanovena experimentálním testováním triplikátů standardů, připravených 10násobným ředěním ref. kmenu MRSA s *mecC*. Na základě výsledné kalibrační křivky a získaného údaje o sklonu křivky (tzv. „slope“) byla E stanovena na 92,4 % u platformy qPCR se sondou FAM-BHQ1 a 78 % u platformy s barvivem SYBR green (Obr. 3, 4), (Livak a Schmittgen, 2001). Pro kvantifikační experimenty a při požadavku na maximální účinnost a citlivost metody doporučujeme používat qPCR se sondou FAM-BHQ1, kdy jsme detekovali vyšší hodnotu efektivnosti amplifikace. Efektivnost kolem 90 % je obecně doporučována jako požadavek pro spolehlivou kvantifikaci cílové sekvence ve zkoumaných vzorcích (Aydiner *et al.*, 2012).

Limit detekce představoval spodní hranici dynamického rozsahu metody a odpovídal kvantitě ca $3,5\text{--}3,7 \times 10^{-5}$ ng ($3,5\text{--}3,7 \times 10^{-2}$ pg) DNA na reakci ($C_p \leq 40$), (Obr. 5). Tato koncentrace představuje přibližně 12 kopií genů *mecC* (počet kopií genů *mecC* odpovídá počtu genomů MRSA, analýzou ref. genomické sekvence MRSA nesoucího *mecC* byla zjištěna pouze jedna kopie genu *mecC*). Na základě experimentálních dat lze tedy konstatovat, že prezentovaná metodika umožňuje detekovat již desítky kopií genu *mecC*.

Použitý propočít: 1 pg DNA = 978 Mb nukleotidů, průměrná délka genomu MRSA byla počítána jako genom o velikosti 2,9 Mb nukleotidů – 1 kopie genomu MRSA pak představuje hmotnostní jednotku $2,96 \times 10^{-3}$ pg.

Test reprodukovatelnosti zahrnoval opakované testování identických sbírkových kmenů a standardů v různém ředění, přičemž jsme zaznamenali zanedbatelné rozdíly v získaných hodnotách C_p ($\phi \pm 0,5 C_p$). Metodika je proto plně reprodukovatelná.

Analýza křivky tání, která je proveditelná ve formátu s barvivem SYBR green, neodhalila tvorbu nespecifických PCR produktů (Obr. 6, 7) Podobně, při klasické PCR s vyhodnocením na agarózovém gelu, rovněž nebyla pozorována tvorba nespecifických PCR produktů (Obr. 2).

Specifita metody ve smyslu její spolehlivosti při identifikaci genu *mecC* byla kromě analýzy *in silico* s pomocí aplikace BLAST testována také experimentálně, formou tzv. testu inkluзивity a testu exkluzivity. Analýza skupiny testovaných kmenů, sestávajících z 9 kmenů MRSA nesoucích *mecC*, 7 kmenů MRSA nesoucích *mecA* a 5 kmenů *S. aureus* odhalila 100% inkluзивitu metody, což znamená, že všechny kmény MRSA nesoucí *mecC* byly identifikovány pozitivně. Experimentálně stanovená 100% exkluzivita pak znamenala, že všechny kmény MRSA s *mecA* a všechny kmény *S. aureus* byly s pomocí prezentované metody identifikovány negativně (Obr. 8).

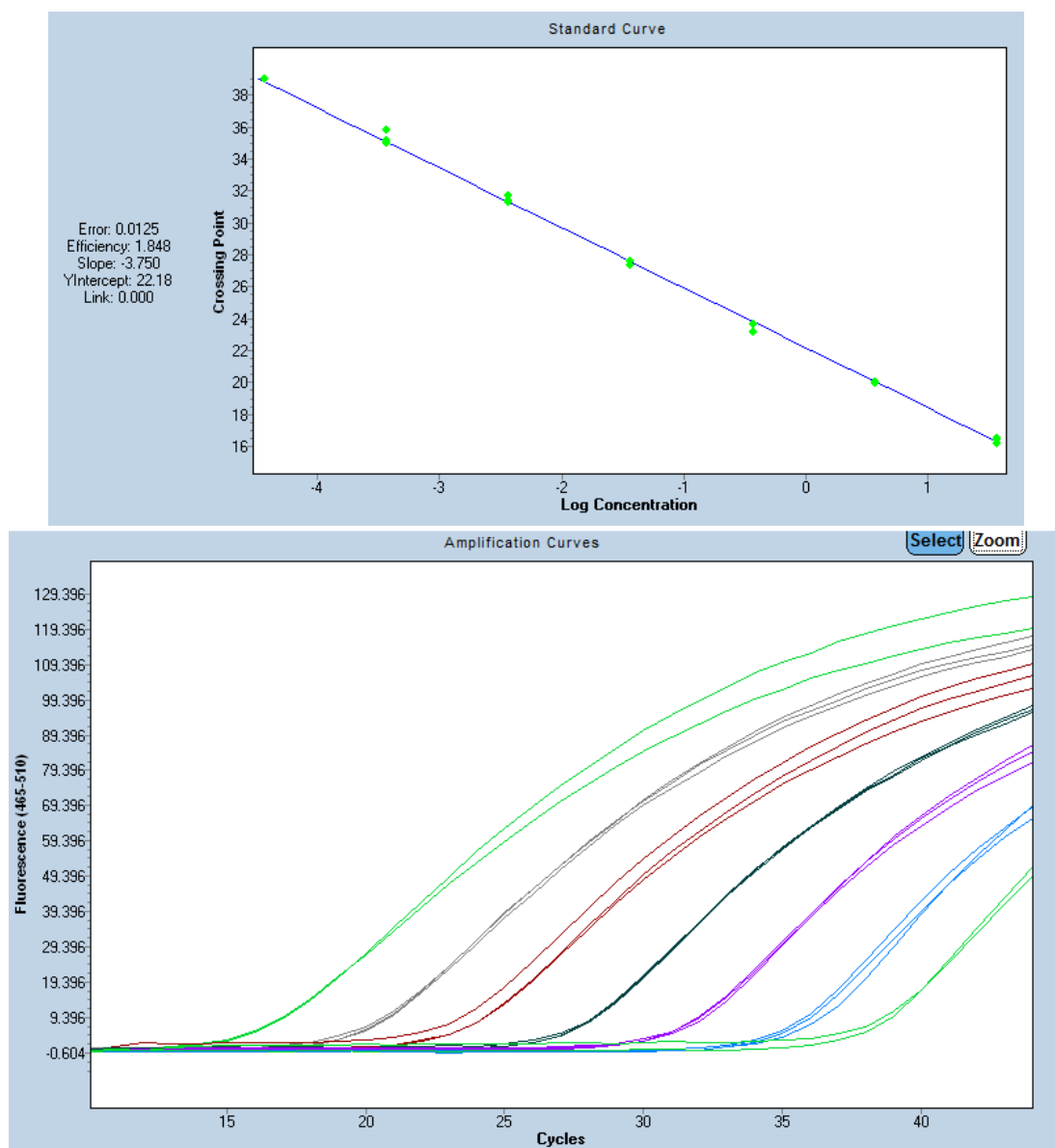
6.6 Sterilita, kontaminace

Pro zachování reprodukovatelnosti metody a pro bezproblémové vykonávání analýz je nezbytné pracovat ve sterilním prostředí, se standardními ochrannými prvky používanými v laboratořích molekulární biologie. Základem jsou rukavice, sterilní špičky pipet, správné uskladnění reagentů a manipulace s nimi. Míchání PCR reakční směsi se provádí ideálně ve sterilním PCR boxu. Důležitým aspektem je zejména manipulace se získanými PCR produkty. Ty by se nikdy neměly otevírat v prostředí, kde dochází k míchání PCR reakcí. Molekuly PCR produktů mohou uniknout do okolního prostředí a mohou kontaminovat budoucí PCR reakce. Jako nástroj detekce kontaminace doporučujeme používat negativní kontrolu, pro zpětnou vazbu o kvalitě analýzy je vhodné používat také pozitivní kontrolu.

6.7 Obrazová příloha

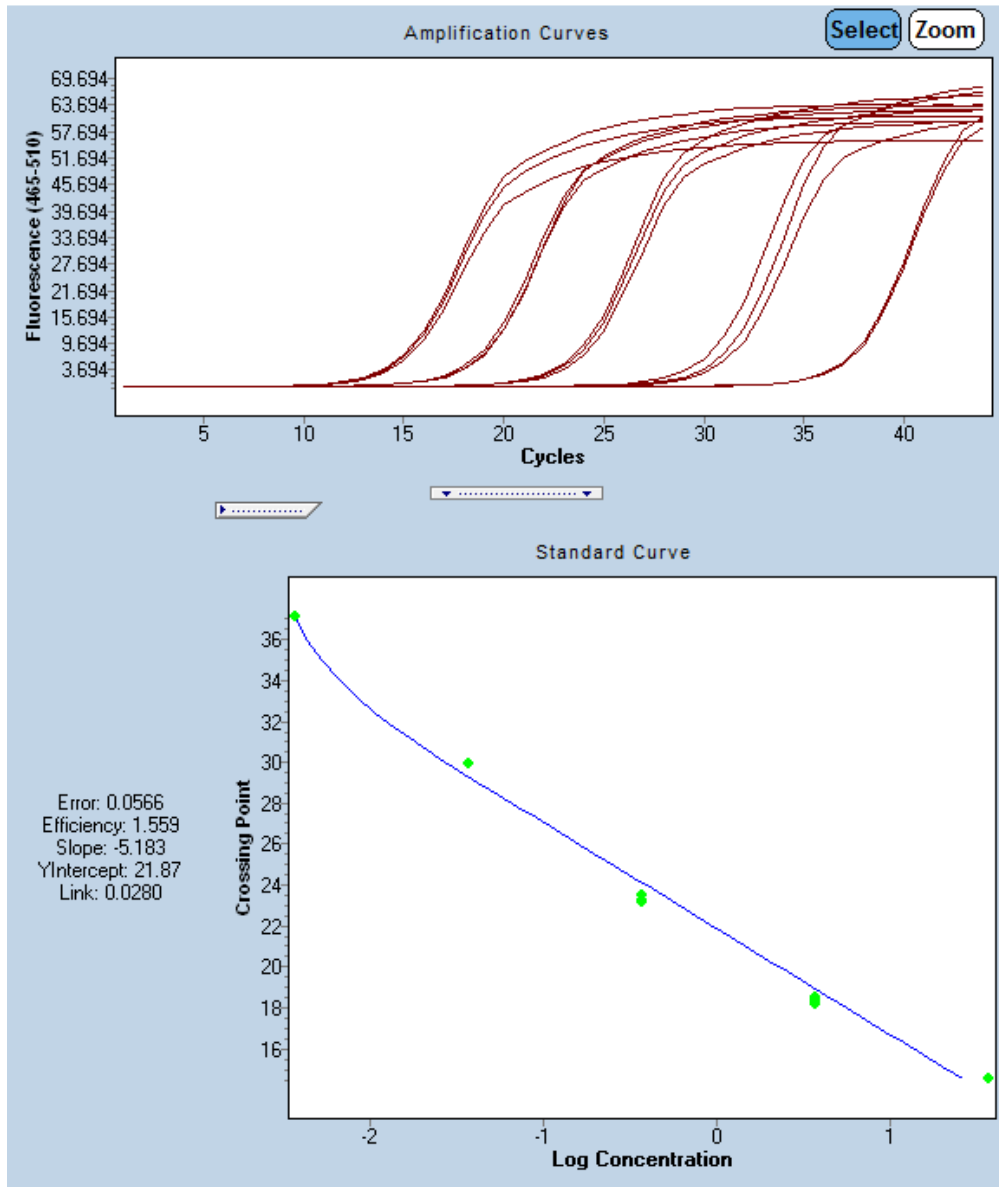
Obr. 3: qPCR *mecC* MRSA - FAM-BHQ1:

Stanovení efektivity amplifikace (E) pomocí standardů, připravených 10× ředěním ref. kmene MRSA, standardy byly použity pro získání kalibrační křivky. E byla automaticky odvozena ze sklonu kalibrační křivky (tzv. slope), její hodnota byla 92,4 %. To poukazuje na robustní a reprodukovatelnou metodu qPCR, použitelnou pro spolehlivou kvantifikaci cílové sekvence. Dynamický rozsah metodiky pro kvantifikační experimenty byl stanoven na 7 magnitud, počínaje vzorkem o koncentraci 40 ng DNA na reakci. Dolní hranici dynamického rozsahu metodiky představovala kvantifikace vzorku o koncentraci ca $3,5 \times 10^{-5}$ ng DNA na reakci (ca 12 kopií genu *mecC*).



Obr. 4: qPCR *mecC* MRSA - SYBR green:

Stanovení efektivnosti amplifikace (E) s pomocí standardů, připravených 10× ředěním ref. kmene MRSA, standardy byly použity pro získání kalibrační křivky. E byla automaticky odvozena ze sklonu kalibrační křivky (tzv. slope), její hodnota byla 78 % (při slope = 2 je E = 100 %).



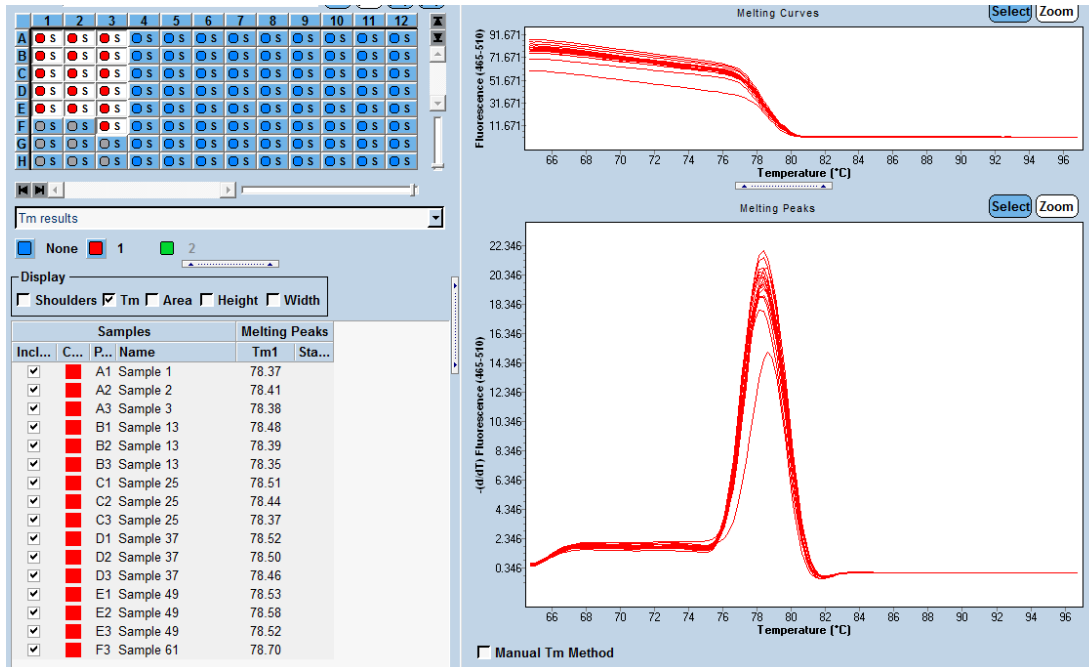
Obr. 5: qPCR *mecC* MRSA - FAM-BHQ1:

Test detekčního limitu. Detekční limit metody byl stanoven experimentálně testováním standardů, připravených 10× ředěním ref. kmene MRSA. Detekční limit metody představuje analýzu s použitím DNA v kvantitě $3,3 - 3,7 \times 10^{-5}$ ($C_p = 39-40$).

Samples				Results		
Inclu...	Co...	Pos	Name	Cp	Conc (ng)	Stand...
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A6	Sample 6	16.18	3.98E1	3.70E1
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A7	Sample 6	16.43	3.40E1	3.70E1
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A8	Sample 6	16.55	3.17E1	3.70E1
<input checked="" type="checkbox"/>	■	B6	Sample 18	19.92	4.00E0	3.70E0
<input checked="" type="checkbox"/>	■	B7	Sample 18	19.98	3.85E0	3.70E0
<input checked="" type="checkbox"/>	■	B8	Sample 18	20.01	3.79E0	3.70E0
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C6	3.7E-1	23.17	5.44E-1	3.70E-1
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C7	3.7E-1	23.66	4.03E-1	3.70E-1
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C8	3.7E-1	23.61	4.15E-1	3.70E-1
<input checked="" type="checkbox"/>	■	D6	Sample 42	27.37	4.12E-2	3.70E-2
<input checked="" type="checkbox"/>	■	D7	Sample 42	27.62	3.55E-2	3.70E-2
<input checked="" type="checkbox"/>	■	D8	Sample 42	27.60	3.59E-2	3.70E-2
<input checked="" type="checkbox"/>	■	E6	Sample 54	31.26	3.78E-3	3.70E-3
<input checked="" type="checkbox"/>	■	E7	Sample 54	31.66	2.97E-3	3.70E-3
<input checked="" type="checkbox"/>	■	E8	Sample 54	31.37	3.54E-3	3.70E-3
<input checked="" type="checkbox"/>	■	F6	Sample 66	35.82	2.32E-4	3.70E-4
<input checked="" type="checkbox"/>	■	F7	Sample 66	35.02	3.78E-4	3.70E-4
<input checked="" type="checkbox"/>	■	F8	Sample 66	35.10	3.58E-4	3.70E-4
<input checked="" type="checkbox"/>	■	G6	Sample 78	39.00	3.28E-5	3.70E-5
<input checked="" type="checkbox"/>	■	G8	Sample 78	39.00	3.28E-5	3.70E-5

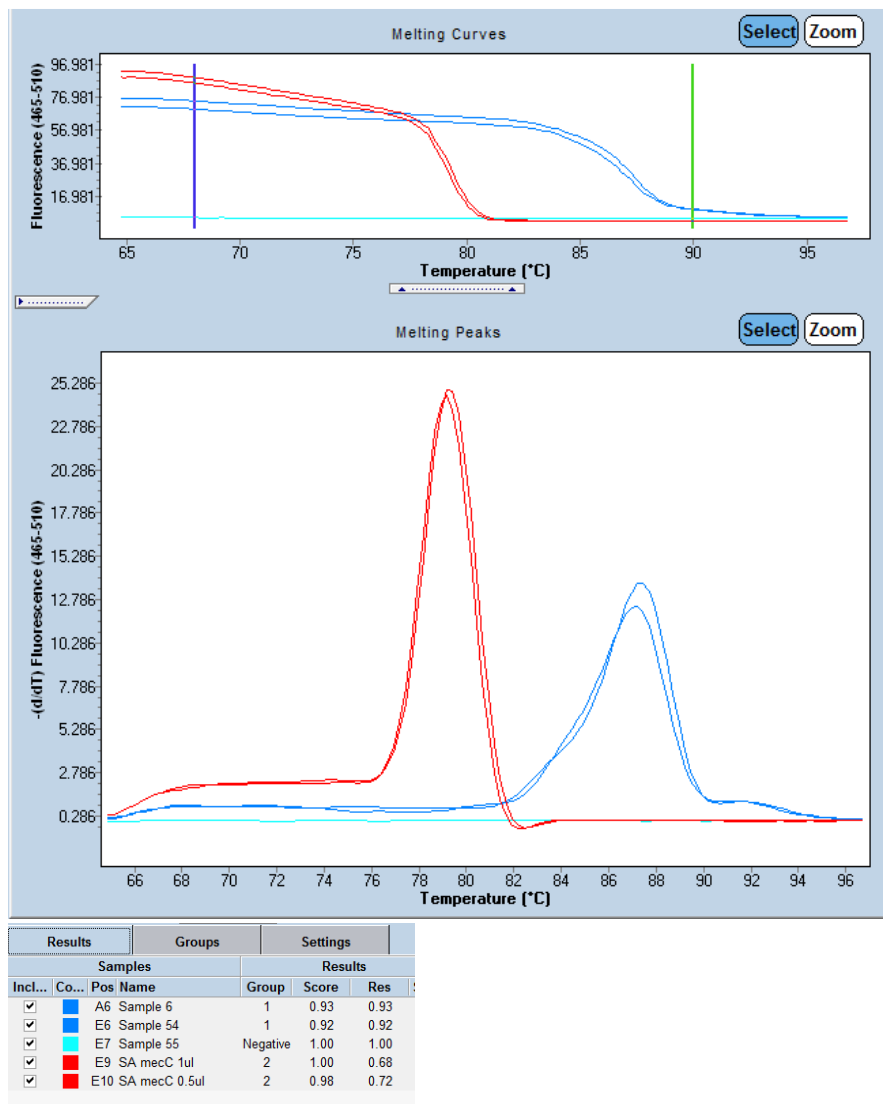
Obr. 6: qPCR *mecC* MRSA - SYBR green:

Test specifiity PCR produktů (kalibrační křivka připravená z izolátu MRSA nesoucího gen *mecC*). Využití funkce „Tm Calling“, automaticky stanovující hodnotnu Tm (°C) melting peaku každého PCR produktu. Všechny amplifikované PCR produkty disponují velice podobnou hodnotou Tm, to poukazuje na identický PCR produkt genu *mecC*.



Obr. 7: qPCR *mecC* MRSA - SYBR green:

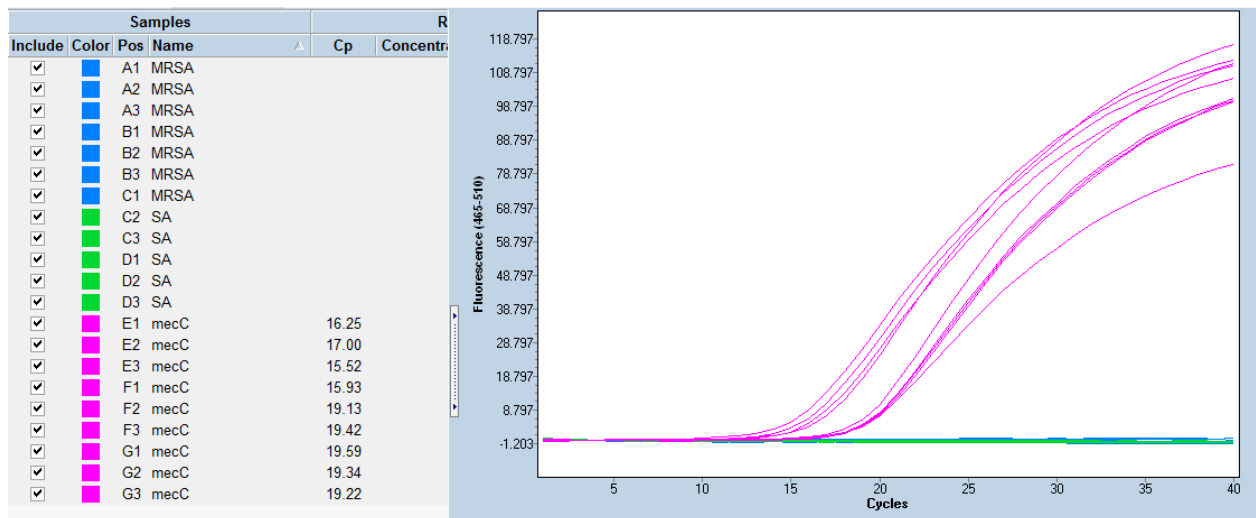
Zkoumání specifity PCR produktů s využitím analýzy křivky tání PCR produktů: Profil tzv. „Melting curve“ je specifický pro PCR produkt genu *mecC*, program automaticky stanovuje konkrétní hodnotu „Melting peaku“ v °C. Při identifikaci hodnoty mimo stanovený interval program automaticky indikuje nespecifický PCR produkt. Pozn.: V případě navržené PCR pro gen *mecC* jsme nezaznamenali amplifikaci nespecifických produktů, program však může i tak sloužit pro zpětnou kontrolu a např. pro eliminaci případné lidské chyby při hodnocení výsledků v paralelní reakci s MRSA nesoucím *mecA*.



červená barva – PCR *mecC* MRSA, modrá – PCR *mecA* MRSA, tyrkysová – negativní kontrola

Obr. 8: qPCR *mecC* MRSA - FAM-BHQ1:

Test specifity, zahrnující test inkuzivity a exkluzivity: qPCR testování 9 kmenů MRSA s *mecC*, 7 kmenů MRSA nesoucích *mecA* a 5 kmenů *S. aureus*. Všechny testované kmeny MRSA nesoucí gen *mecC* byly identifikovány pozitivně (test inkuzivity). Všechny kmeny MRSA nesoucí gen *mecA* a všechny testované kmeny *S. aureus* byly testovány negativně (test exkluzivity). Uvedené výsledky demonstrují specifitu a spolehlivost prezentované metody.



modrá – MRSA *mecA* , zelená - *S. aureus* , purpurová - MRSA *mecC*

Obr. 9. Ref. sekvence genu *mecC*, uložené v databázi GenBank (www.ncbi.nih.gov):

Srovnání těchto sekvencí s pomocí aplikace BLAST odhalilo jejich 100 % identitu a poukázalo na vysokou konzervativnost nově pozorované formy genu *mec* - *mecC*. Sekvence FR821779.1 (GenBank) představuje první záznam o nové formě genu *mec* - byla publikována v roce 2011 (Garcia-Alvarez *et al.*, 2011), kmen byl označen jako MRSA_{LGA251}.

GenBank: KT192641.1

>gi|871340505|gb|KT192641.1| *Staphylococcus aureus* strain TRN6234 alternate penicillin-binding protein (*mecC*) gene, complete cds

```

ATGAAAAAATTTATATTAGTGTGCTAGTTCTTTTACTAATTATGATTATAATAACTTGGTTATTCAAAG
ATGACGATATTGAGAAAACAATTAGTTCTATTGAAAAAGGAACTATAACGAAGTATATAAAAAATAGTTC
AGAAAAATCTAACTGGCATATGGAGAAGAAGAAATTGTAGATAGGAATAAAAAAATTTACAAAAGATTTA
AGTGTCAATAACTTAAAAATTAATAATCATGAAATTAAAAAAACTGGAAAAGATAAAAAAGCAAGTTGATG
TTAAATATAACATATATACAAAATATGGAACATACGACGTAATACACAATTAACCTTTATTTATGAAGA
TAAGCATTGGAAATTAGATTGGAGACCAGACGTAATAGTACCTGGTTTGGAAAATGGACAGAAAATTAAT
ATAGAAACATTAATAATCAGAGCGAGGCAAAATAAAGATAGAAATGGTATAGAATTAGCTAAAACCTGGAA
ATACATATGAAATCGGTATTGTCCCTAACAAAACACCCAAAAGAAAAATATGATGATATTGCTCGTGACTT
ACAAATTGATACAAAAGCTATAACCAATAAAGTTAATCAAAAATGGGTTTCAGCCAGATTCATTTGTACCA
ATTA AAAAGATAAATAAACAAGATGAATATATAGACAAATTAATTAATCATACAATTTACAAAATAACA
CTATAAAAAGCCGTGTTTATCCATTGAACGAAGCAACAGTACACCTTTTAGGTTATGTGGGTCCAATTAA
TTCTGACGAGTTAAAAAGTAAGCAATTTAGAACTATAGCAAAAATACTGTTATTGGAAAAAAGGCTTA
GAACGCCTTATGATAACAATTGCAAAAACATGATGGTTTAAAGGTATCCATTGCAAATACTTATGACA
ATAAACCTTTAGACACATTATTGGAGAAAAAGCTGAAAACGGAAAAGATCTTCATTTAACTATAGATGC
TAGAGTACAAGAAAGTATTTATAAACATATGAAAAATGACGATGGATCTGGTACAGCATTACAACCAAAA
ACTGGAGAAATTTTAGCTTTGGTAAGTACCCCATCGTACGATGTTTATCCATTCATGAATGGATTAAGCA

```

ATAATGACTACCGTAAATTAACATAACAAATAAAAAAGAGCCTTTGCTCAACAAATTTCAAATCACTACATC
ACCAGGTTCAACCCAAAAAATATTAACATCTATTATAGCCTTAAAAAGAAAATAAACTAGACAAAAATACT
AATTTTGATATTTATGGTAAGGGTTGGCAAAAAGATGCATCATGGGGGAATTATAATATCACAAAGATTTA
AAGTAGTAGACGGCAATATCGATTTAAAGCAAGCAATAGAATCATCAGACAACATATTTTTTTGCCCGCAT
TGCATTAGCATTAGGAGCCAAAAAATTTGAGCAAGGTATGCAAGATTTGGGAATCGGTGAAAAATATCCCG
AGTGATTATCCCTTTTATAAAGCACAAATCTCAAATAGTAATTTAAAAAATGAAATATTATTAGCAGATT
CAGGATATGGCCAAGGCGAGATACTAGTAAACCCTATACAAATTTTATCAATATACAGTGCTTTAGAAAA
TAACGGAAATATACAAAATCCTCATGTTTTACGTAAAAACAAAATCTCAAATATGGAAAAAAGATATTATA
CCTAAAAAAGACATAGATATATTAACATAATGGTATGGAACGTGTAGTTAATAAAAAACATAGGGATGATA
TATACAAAAAATTATGCCCGAATTTATTGGTAAATCTGGCACAGCAGAATTAATAAATGAATCAAGGGGAAAC
TGGAAGACAAATAGGTTGGTTTTGTTTCATATAATAAAAAATAATCCTAATATGTTAATGGCGATTAATGTT
AAAGACGTTCAAATAAAGGGATGGCCAGCTATAATGCTACTATATCTGGAAAAAGTTTATGATGATTTGT
ATGATAATGGAAAACTCAATTTGATATAGATCAGTAA

NCBI Reference Sequence: NG_047955.1

>gi|1035502134|ref|NG_047955.1| *Staphylococcus aureus* M10/0061 mecC gene
for PBP2a family beta-lactam-resistant peptidoglycan transpeptidase MecC,
complete CDS

TGTTACACCTCACTTCTTAACATTATATCATTATTTTGACAAACAGACTACAAATGTAATATTATTGG
ATTACATTTGTAGTACAAAAGGAGGAAGAGATGAAAAAATTTATATTAGTGTGCTAGTTCCTTTACTAA
TTATGATTATAATAACTTGGTTATTCAAAGATGACGATATTGAGAAAAAATAGTTCATTGAAAAAGG
AACTATAACGAAGTATATAAAAAATAGTTCAGAAAAATCTAAACTGGCATAATGGAGAAGAAGAAATGTA
GATAGGAATAAAAAAATTTACAAAGATTTAAGTGTCAATAACTTAAAAATTAATAATCATGAAATTA
AACTGGAAAAAGATAAAAAAGCAAGTTGATGTTAAATATAACATATATACAAAATATGGAACTATACGACG
TAATACACAATTAACCTTTATTTATGAAGATAAGCATTGGAAATTAGATTGGAGACCAGACGTAATAGTA
CCTGGTTTGAAAAATGGACAGAAAATTAATATAGAAACATTAATAATCAGAGCGAGGCAAAAAATAAAGATA
GAAATGGTATAGAATTAGCTAAAACCTGGAAATACATATGAAATCGGTATTGTCCCTAACAAAAACCCCAA
AGAAAAATATGATGATATTGCTCGTGACTTACAAATTGATACAAAAGCTATAACCAATAAAGTTAATCAA
AAATGGGTTTCAGCCAGATTTCAATTTGTACCAATTAATAAAGATAAATAAACAAGATGAATATATAGACAAAT
TAATTAATCATCAATTTACAAATAAACACTATAAAAAAGCCGTGTTTATCCATTGAACGAAGCAACAGT
ACACCTTTTAGGTTATGTGGGTCCAATTAATTTCTGACGAGTTAAAAAGTAAGCAATTTAGAAACTATAGC
AAAAATACTGTTATTGGAAAAAAGGCTTAGAACGCCTCTATGATAAACAATTGCAAAAACACTGATGGTT
TTAAGGTATCCATTGCAATACTTATGACAATAAACCTTTAGACACATTTATTGGAGAAAAAGGCTGAAAA
CGGAAAAGATCTTCATTTAACTATAGATGCTAGAGTACAAGAAAGTATTTATAAACATATGAAAAATGAC
GATGGATCTGGTACAGCATTACAACCAAAAACCTGGAGAAATTTTAGCTTTGGTAAGTACCCCATCGTACG
ATGTTTATCCATTGATGAATGGATTAAGCAATAATGACTACCGTAAATTAACATAAATAAAAAAGAGCC
TTTGCTCAACAAATTTCAAATCACTACATCACCAGGTTCAACCCAAAAAATATTAACATCTATTATAGCC
TTAAAAGAAAATAAACTAGACAAAAATACTAATTTTGTATTTTATGGTAAGGGTTGGCAAAAAGATGCAT
CATGGGGTAATTATAATATCACAAAGATTTAAAGTAGTAGACGGCAATATCGATTTAAAGCAAGCAATAGA
ATCATCAGACAACATATTTTTTTGCCCGCATTGCATTAGCATTAGGAGCCAAAAAATTTGAGCAAGGTATG
CAAGATTTGGGAATCGGTGAAAAATATCCCGAGTGATTATCCCTTTTATAAAGCACAAATCTCAAATAGTA
ATTTAAAAAATGAAATATTATTAGCAGATTGAGGATATGGCCAAGGCGAGATACTAGTAAACCCTATACA
AATTTTATCAATATACAGTGCTTTAGAAAAAATACGGAAATATACAAAATCCTCATGTTTTACGTAAAAA
AAATCTCAAATATGGAAAAAAGATATTATACCTAAAAAAGACATAGATATATTAACATAATGGTATGGAAC
GTGTAGTTAATAAAAACACATAGGGATGATATATACAAAATTTATGCCCGAATTTATTGGTAAATCTGGCAC
AGCAGAATTAATAAATGAATCAAGGGGAAACTGGAAGACAAATAGGTTGGTTTGTTCATATAATAAAAAAT
AATCCTAATATGTTAATGGCGATTAATGTTAAAGACGTTCAAATAAAGGGATGGCCAGCTATAATGCTA
CTATATCTGGAAAAAGTTTATGATGATTTGTATGATAATGGAAAAACTCAATTTGATATAGATCAGTAAT
CGAATACTTCTTTTACTTGGTATTAATAAAAAATAAGTGAAGCGTTTCCACAAAGATTACATTTG
TAATATATAGGAGGAATAAAATTGAAAA

GenBank: KU867950.1

>gb|KU867950.1|:15504-17501 *Staphylococcus aureus* strain ST425 site-
specific recombinase CcrA1 (ccrA1), site-specific recombinase CcrB3
(ccrB3), penicillin resistance regulatory protein MecI (mecI), methicillin
resistance protein MecR1 (mecR1), beta-lactam inducible penicillin binding
protein 2c (mecC), and beta-lactamase (blaZ) genes, complete cds
ATGAAAAAATTTATATTAGTGTGCTAGTTCCTTTACTAATTATGATTATAAATAACTTGGTTATTCAAAG
ATGACGATATTGAGAAAAAATAGTTCATTGAAAAAGGAACTATAACGAAGTATATAAAAAATAGTTC
AGAAAAATCTAAACTGGCATAATGGAGAAGAAGAAATTTAGATAGGAATAAAAAAATTTACAAAGATTTA
AGTGTCAATAACTTAAAAATTAATAATCAATCATGAAATTAAAAAAATGGAAGATAAAAAAGCAAGTTGATG

TTAAATATAACATATATACAAAATATGGAACCTATACGACGTAATACACAATTAACCTTTATTTATGAAGA
TAAGCATTGGAAATTAGATTGGAGACCAGACGTAATAGTACCTGGTTTTGAAAAATGGACAGAAAATTAAT
ATAGAAACATTAATAATCAGAGCGGAGGCAAAATAAAAGATAGAAATGGTATAGAATTAGCTAAAACTGGAA
ATACATATGAAATCGGTATTGTCCCTAACAAAAACCCAAAAAGAAAAATATGATGATATTGCTCGTGACTT
ACAAATTGATACAAAAGCTATAACCAATAAAGTTAATCAAAAATGGGTTTCAGCCAGATTCAATTTGTACCA
ATTA AAAAGATAAATAAACAAGATGAATATATAGACAAATTAATTAATCATACAATTTACAAAATAACA
CTATAAAAAGCCGTGTTTTATCCATTGAACGAAGCAACAGTACACCTTTTAGGTTATGTGGGTCCAATTAA
TTCTGACGAGTTAAAAAGTAAGCAATTTAGAACTATAGCAAAAATACTGTTATTGGAAAAAAGGCTTA
GAACGCCTCTATGATAACAATTGCAAAAACACTGATGGTTTTAAGGTATCCATTGCAAACTATTATGACA
ATAAACCTTTAGACACATTATTGGAGAAAAAGGCTGAAAACGGAAAAAGATCTTCATTTAACTATAGATGC
TAGAGTACAAGAAAGTATTTATAAACATATGAAAAATGACGATGGATCTGGTACAGCATTACAACCAAAA
ACTGGAGAAATTTTAGCTTTGGTAAGTACCCCATCGTACGATGTTTATCCATTCATGAATGGATTAAGCA
ATAATGACTACCGTAAATTAAC TAACAATAAAAAAGAGCCTTTGCTCAACAAAATTTCAAACTACTACATC
ACCAGGTTCAACCCAAAAATATTAACATCTATTATAGCCTTAAAAAGAAAAATAA ACTAGACAAAAATACT
AATTTTGATATTTATGGTAAGGGTTGGCAAAAAGATGCATCATGGGGGAATTATAATATCACAAGATTTA
AAGTAGTAGACGGCAATATCGATTTAAAGCAAGCAATAGAATCATCAGACAACATATTTTTTGCCCGCAT
TGCATTAGCATTAGGAGCCAAAAAATTTGAGCAAGGTATGCAAGATTTGGGAATCGGTGAAAAATATCCCG
AGTGATTATCCCTTTTATAAAGCACAAATCTCAAATAGTAATTTAAAAAATGAAATATTTATAGCAGATT
CAGGATATGGCCAAGGCGAGATACTAGTAAACCTTATACAAAATTTTATCAATATACAGTGCTTTAGAAAA
TAACGGAAATATACAAAATCCTCATGTTTTACGTAAAACAAAATCTCAAATATGGAAAAAAGATAATTATA
CCTAAAAAAGACATAGATATATTAAC TAATGGTATGGAACGTGTAGTTAATAAAAAACATAGGGATGATA
TATACAAAATTATGCCCGAATTATTGGTAAATCTGGCACAGCAGAATTA AAAATGAATCAAGGGGAAAC
TGGAAGACAAATAGGTTGGTTTTGTTTCATATAATAAAAAATAATCCTAATATGTTAATGGCGATTAATGTT
AAAGACGTTCAAAATAAAGGGATGGCCAGCTATAATGCTACTATATCTGGAAAAGTTTATGATGATTTGT
ATGATAATGGAAAACTCAATTTGATATAGATCAGTAA

GenBank: LK024544.1

>gi|657406205:4534-6531 *Staphylococcus aureus* SCCmec type XI region, strain
ZTA09/03698-9ST

TTACTGATCTATATCAAATTGAGTTTTTCCATTATCATACAATCATCATAAACTTTTTCCAGATATAGTA
GCATTATAGCTGGCCATCCCTTTATTTTGAACGTCTTTAACATTAATCGCCATTAACATATTAGGATTAT
TTTTATTATATGAAACAAACCAACCTATTTGTCTTCCAGTTTTCCCTTGATTCATTTTTAATTCGCTGT
GCCAGATTTACCAATAATTCGGGCATAAATTTTGTATATATCATCCCTATGTGTTTTATTA ACTACACGT
TCCATACCATTAGTTAATATATCTATGTCTTTTTTAGTATAATATCTTTTTTCCATATTTGAGATTTTG
TTTTACGTAAAACATGAGGATTTTGTATATTTCCGTTATTTTCTAAAGCACTGTATATTGATAAAAATTTG
TATAGGGTTTTACTAGTATCTCGCCTTGGCCATATCCTGAATCTGCTAATAATATTTCAATTTTTTAAATTA
CTATTTGAGATTTGTGCTTTATAAAAAGGGATAATCACTCGGGATATTTTACCGGATTCCCAAACTTTGCA
TACCTTGCTCAAATTTTTTGGCTCCTAATGCTAATGCAATGCGGGCAAAAAATATGTTGTCTGATGATTC
TATTGCTTGCTTTAAATCGATATTGCCGTCTACTACTTTAAATCTTGTGATATTATAATFCCCCATGAT
GCATCTTTTTGCCAACCTTACCATAAATATCAAAATTAGTATTTTTGTCTAGTTTATTTCTTTTAAAGG
CTATAATAGATGTTAATATTTTTTGGGTTGAACCTGGTGTAGTGTAGTTGAAATTTGTTGAGCAAAGG
CTCTTTTTTATTGTTAGTTAATTTACGGTAGTCATTATTGCTTAATCCATTCATGAATGGATAAACATCG
TACGATGGGGTACTTACCAAAGCTAAAATTTCTCCAGTTTTTGGTTGTAATGCTGTACCAGATCCATCGT
CATTTTTCATATGTTTATAAATACTTTCTTGTACTCTAGCATCTATAGTTAAATGAAGATCTTTTCCGTT
TTCAGCCTTTTTCTCCAATAATGTGTCTAAAGGTTTTATTGTCATAAGTATTTGCAATGGATACCTTAAAA
CCATCAGTGTTTTGCAATTGTTTATCATAGAGGCGTTCTAAGCCTTTTTTTCCAATAACAGTATTTTTGC
TATAGTTTCTAAATTGCTTACTTTTTAACTCGTCAGAATTAATTGGACCCACATAACCTAAAAGGTGTAC
TGTTGCTTCGTTCAATGGATAAACACGGCTTTTTATAGTGTTTATTTGTAAATTTGTATGATTTAATTAAT
TGTCTATATATTCATCTTGTTTATTTATCTTTTTAATTGGTACAAATGAATCTGGCTGAACCCATTTTT
GGTGTTTTTATTGGTTATAGCTTTTTGTATCAATTTGTAAGTCACGAGCAATATCATCATATTTTTCTTT
GGGTATTTTTGTTAGGGACAATACCGATTTTCATATGTATTTCCAGTTTTAGCTAATCTATACCATTTCTA
TCTTTTTATTTGCTCGCTCTGATTTAATGTTTCTATATTAATTTCTGTCCATTTTCAAACAGGTA
CTATTACGTCTGGTCTCCAATCTAATTTCCAATGCTTATCTTCATAAATAAAGTTTAAATTTGTGTATTACG
TCGTATAGTTCCATATTTTGTATATATGTTATATTTAACATCAACTTGCTTTTTTATCTTTTCCAGTTTTT
TTAATTTTCATGATTAGTAATTTTTAAGTTATTGACACTTAAATCTTTGTAAATTTTTTTTATTCCTATCTA
CAATTTCTTCTTCCATATGCCAGTTTAGATTTTTCTGAACTATTTTTTATATACTTCGTTATAGTTTCC
TTTTTCAATAGA ACTAATTTGTTTTCTCAATATCGTCATCTTTGAATAACCAAGTTATTATAATCATAATT
AGTAAAAGA ACTAGCACACTAATATAAATTTTTTTTCAT

NCBI Reference Sequence: NZ_CSBF01000001.1

>gi|916220418:393015-395012 *Staphylococcus aureus* genome assembly
7907_7#24, scaffold ERS104548SContig000001, whole genome shotgun sequence
TTACTGATCTATATCAAATTGAGTTTTTCCATTATCATACAAATCATCATAAACTTTTCCAGATATAGTA
GCATTATAGCTGGCCATCCCTTTATTTTGAACGTCTTTAACATTAATCGCCATTAACATATTAGGATTAT
TTTTATTATATGAAACAAACCAACCTATTTGTCTTCCAGTTTTCCCCTTGATTCATTTTTAATTCGCTGT
GCCAGATTTACCAATAATTCGGGCATAATTTTTGTATATATCATCCCTATGTGTTTTTATTAACCTACACGT
TCCATACCATTAGTTAATATATCTATGTCTTTTTTTAGGTATAATATCTTTTTTTCCATATTTGAGATTTTG
TTTTACGTA AAAACATGAGGATTTTGTATATTTCCGTTATTTTTCTAAAGCACTGTATATTGATAAAAATTTG
TATAGGGTTTTACTAGTATCTCGCCTTGGCCATATCCTGAATCTGCTAATAATATTTTCATTTTTTAAATTA
CTATTTGAGATTTGTGCTTTATAAAAAGGGATAATCACTCGGGATATTTTCACCGATTCCCAAATCTTGCA
TACCTTGCTCAAATTTTTTGGCTCCTAATGCTAATGCAATGCGGGCAAAAAATATGTTGTCTGATGATTC
TATTGCTTGCTTTAAATCGATATTGCCGTCTACTACTTTAAATCTTGTGATATTATAATTCCCCCATGAT
GCATCTTTTTGCCAACCTTACCATAAAATATCAAAATTAGTATTTTTGTCTAGTTTATTTTTCTTTAAGG
CTATAATAGATGTTAATATTTTTTTGGGTTGAACCTGGTGATGTAGTGATTTGAAATTTGTTGAGCAAAGG
CTCTTTTTTATTGTTAGTTAATTTACGGTAGTCATTATTGCTTAATCCATTTCATGAATGGATAAACATCG
TACGATGGGGTACTTACCAAAGCTAAAATTTCTCCAGTTTTTGGTTGTAATGCTGTACCAGATCCATCGT
CATTTTTTCATATGTTTATAAATACTTTCTTGTACTCTAGCATCTATAGTTAAATGAAGATCTTTTCCGTT
TTCAGCCTTTTTCTCCAATAATGTGTCTAAAGGTTTATTGTCATAAGTATTTGCAATGGATACCTTAAAA
CCATCAGTGTTTTGCAATTGTTTATCATAGAGGCGTTCTAAGCCTTTTTTTCCAATAACAGTATTTTTGC
TATAGTTTCTAAATTGCTTACTTTTTAACTCGTCAGAATTAATTGGACCCACATAACCTAAAAGGTGTAC
TGTTGCTTCGTTCAATGGATAAACACGGCTTTTTTATAGTGTTTATTTGTAAATGTATGATTTAATTAAT
TTGTCTATATATTCATCTTGTTTATTTATCTTTTTAATTGGTACAAATGAATCTGGCTGAACCCATTTTT
GATTAACCTTTATTGGTTATAGCTTTTTGTATCAATTTGTAAGTCACGAGCAATATCATCATATTTTTCTTT
GGGTGTTTTGTTAGGGACAATACCGATTTTCATATGTATTTCCAGTTTTAGCTAATTCATATACCATTTCTA
TCTTTTTATTTTGCCTCGCTCTGATTTAATGTTTCTATATTAATTTTTCTGTCCATTTTTCAAACAGGTA
CTATTACGTCTGGTCTCCAATCTAATTTCCAATGCTTATCTTCATAAAATAAAGTTTAAATTTGTGTATTACG
TCGTATAGTTCCATATTTTGTATATATGTTATATTTAACATCAACTTGCTTTTTATCTTTTCCAGTTTTT
TTAATTTTCATGATTAGTAATTTTTAAGTTATTGACACTTAAATCTTTGTAAATTTTTTATTCCTATCTA
CAATTTCTTCTTCCATATGCCAGTTTAGATTTTTCTGAACTATTTTTATATACTTCGTTATAGTTTCC
TTTTTCAATAGAATAATTGTTTTCTCAATATCGTCATCTTTGAATAACCAAGTTATTATAATCATAATT
AGTAAAAGAACTAGCACACTAATATAAAATTTTTTTTCAT

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* LGA251 complete genome sequence

GenBank: FR821779.1

>gi|344176319:35681-37678 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* LGA251
complete genome sequence
TTACTGATCTATATCAAATTGAGTTTTTCCATTATCATACAAATCATCATAAACTTTTCCAGATATAGTA
GCATTATAGCTGGCCATCCCTTTATTTTGAACGTCTTTAACATTAATCGCCATTAACATATTAGGATTAT
TTTTATTATATGAAACAAACCAACCTATTTGTCTTCCAGTTTTCCCCTTGATTCATTTTTAATTCGCTGT
GCCAGATTTACCAATAATTCGGGCATAAATTTTTGTATATATCATCCCTATGTGTTTTTATTAACCTACACGT
TCCATACCATTAGTTAATATATCTATGTCTTTTTTTAGGTATAATATCTTTTTTTCCATATTGAGATTTTG
TTTTACGTA AAAACATGAGGATTTTGTATATTTCCGTTATTTTTCTAAAGCACTGTATATTGATAAAAATTTG
TATAGGGTTTTACTAGTATCTCGCCTTGGCCATATCCTGAATCTGCTAATAATATTTTCATTTTTTAAATTA
CTATTTGAGATTTGTGCTTTATAAAAAGGGATAATCACTCGGGATATTTTCACCGATTCCCAAATCTTGCA
TACCTTGCTCAAATTTTTTGGCTCCTAATGCTAATGCAATGCGGGCAAAAAATATGTTGTCTGATGATTC
TATTGCTTGCTTTAAATCGATATTGCCGTCTACTACTTTAAATCTTGTGATATTATAATTCCCCCATGAT
GCATCTTTTTGCCAACCTTACCATAAAATATCAAAATTAGTATTTTTGTCTAGTTTATTTTTCTTTAAGG
CTATAATAGATGTTAATATTTTTTTGGGTTGAACCTGGTGATGTAGTGATTTGAAATTTGTTGAGCAAAGG
CTCTTTTTTATTGTTAGTTAATTTACGGTAGTCATTATTGCTTAATCCATTTCATGAATGGATAAACATCG
TACGATGGGGTACTTACCAAAGCTAAAATTTCTCCAGTTTTTGGTTGTAATGCTGTACCAGATCCATCGT
CATTTTTTCATATGTTTATAAATACTTTCTTGTACTCTAGCATCTATAGTTAAATGAAGATCTTTTCCGTT
TTCAGCCTTTTTCTCCAATAATGTGTCTAAAGGTTTATTGTCATAAGTATTTGCAATGGATACCTTAAAA
CCATCAGTGTTTTGCAATTGTTTATCATAGAGGCGTTCTAAGCCTTTTTTTCCAATAACAGTATTTTTGC
TATAGTTTCTAAATTGCTTACTTTTTAACTCGTCAGAATTAATTGGACCCACATAACCTAAAAGGTGTAC
TGTTGCTTCGTTCAATGGATAAACACGGCTTTTTTATAGTGTTTATTTGTAAATGTATGATTTAATTAAT
TTGTCTATATATTCATCTTGTTTATTTATCTTTTTAATTGGTACAAATGAATCTGGCTGAACCCATTTTT
GATTAACCTTTATTGGTTATAGCTTTTTGTATCAATTTGTAAGTCACGAGCAATATCATCATATTTTTCTTT

```
GGGTGTTTTGTTAGGGACAATACCGATTTTCATATGTATTTCCAGTTTTAGCTAATTCTATACCATTTCTA
TCTTTTATTTTGCCTCGCTCTGATTTTAATGTTTCTATATTAATTTTCTGTCCATTTTCAAACCAGGTA
CTATTACGTCTGGTCTCCAATCTAATTTCCAATGCTTATCTTCATAAAATAAAGTTTAATTTGTGTATTACG
TCGTATAGTTCCATATTTTGTATATATGTTATATTTAAACATCAACTTGCTTTTTATCTTTTCCAGTTTTT
TTAATTTTCATGATTAGTAATTTTAAAGTTATTGACACTTAAATCTTTGTAAATTTTTTTATTCCATCTA
CAATTTCTTCTTCTCCATATGCCAGTTTAGATTTTCTGAACTATTTTTATATACTTCGTTATAGTTTCC
TTTTTCAATAGAACTAATTGTTTTCTCAATATCGTCATCTTTGAATAACCAAGTTATTATAATCATAATT
AGTAAAAGAAGTACTAGCACACTAATATAAATTTTTTTTCAT
```

III Zdůvodnění, srovnání novosti postupu

MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) je důležitým patogenem v celosvětovém měřítku. Zavedení přísných epidemiologických opatření pro zamezení dalšího šíření kmenů MRSA ve Skandinávských státech nebo v Holandsku se osvědčilo jako účinné opatření splňující stanovený cíl, jelikož výskyt MRSA v těchto státech je velice nízký (Bode *et al.*, 2011, Tiemersma *et al.*, 2005). Pro účinné plnění takovýchto opatření je ovšem důležité disponovat rychlými a spolehlivými diagnostickými metodami identifikace MRSA. Optimální alternativou je kombinace kultivačních technik (po identifikaci druhu se nejčastěji monitoruje rezistence na cefoxitin) s konfirmací pomocí molekulárně-genetických metod (Aydiner *et al.*, 2012; Kluytmans-van den Bergh *et al.*, 2014). Výhodou molekulárně-genetických metod ve srovnání s kultivačními techniky je zejména rychlost jejich provedení, reprodukovatelnost, nebo přístupnost k automatizaci. Molekulární metody identifikace MRSA jsou postaveny nejčastěji na *S. aureus* - specifické PCR, doplněné o PCR detekující gen *mecA*. Ten je genetickým determinantem pro fenotyp methicilinové/oxacilinové rezistence. Příkladem uvedeného přístupu je metodika dle Manga a Vyleťelová (2013), využívající qPCR identifikaci sekvence genu *nuc* specifickou pro *S. aureus*, která je doplněná o PCR genu *mecA*. Při uvedené strategii je pak při testování směsných vzorků vhodné kalkulovat s možným výskytem MRCNS (methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci), které by mohly ovlivnit vyhodnocení výsledků. Řešením je srovnávání Cp hodnot u obou qPCR, tj. qPCR testující *S. aureus* specifickou sekvencí a qPCR testující *mecA* gen, nebo práce s čistými kultury. Jiným přístupem je metoda qPCR, identifikující tzv. SCC*mec* element (staphylococcal cassette chromosome *mec* element), obsahující jak *mecA* gen, tak i *S. aureus* specifický gen *orfX* (SCC*mec-orfX*) (Huletsky *et al.*, 2004). Na uvedeném přístupu jsou založené některé komerčně vyráběné metody identifikace MRSA (Xpert MRSA assay (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA; GeneOhm MRSA assay (BD Diagnostics, San Diego, CA, USA), jakkoli, ani tyto metody nejsou při identifikaci MRSA plně spolehlivé (Rossney *et al.*, 2008; Snyder *et al.*, 2010). Jedním z důvodů problémů se spolehlivostí těchto metod je vysoká diverzita sekvence SCC*mec-orfX*. Recentní objev nového homologu *mecA* – genu *mecC* (Garcia-Alvarez *et al.*, 2011), který nelze detekovat ani jednou z výše popsáních strategií, opět zkomplikoval spolehlivost molekulární detekce MRSA.

Prezentovaná uplatněná certifikovaná metodika poskytuje účinné řešení pro vzniklou situaci. Optimalizovaný, originální návrh qPCR identifikace slouží jako doplnění k jiným qPCR metodám identifikace MRSA, s cílem zavedení spolehlivějšího, vysoce výkonného molekulárního screeningového nástroje. Konkrétní alternativou pro využití metody při spolehlivější identifikaci MRSA je např. suplementace metody Manga a Vyleťelová, (2013). Existence podobné metody qPCR pro identifikaci genu *mecC* v ČR není autorům prezentované

certifikované metodiky známa. Ve světě již byly publikovány PCR metody identifikace nové formy MRSA nesoucí *mecC*. In silico analýza těchto metod ovšem naznačuje, že mnohé z nich nepředstavují varianty vhodné pro rutinní, plošné testování (detailnější komentář v kapitole 6.2 „Publikované metody PCR pro gen *mecC*“). Autoři certifikované metodiky se proto rozhodli pro vlastní, originální návrh metody na principu qPCR. Dle aktuálních poznatků existuje pouze jediný komerčně vyráběný kit, který zohledňuje i detekci *mecC* MRSA, v ČR není distribuován (MRSA/SA Elite MGB[®] Kit; EliTech Molecular Diagnostics, Puteaux, France).

IV Popis uplatnění Certifikované metodiky

Prezentovaná certifikovaná metodika je určena k využívání primárně pro chovatele hospodářských zvířat a pro mikrobiologické diagnostické laboratoře, nebo pro veterinární klinickou diagnostiku. Druh *S. aureus* včetně jeho methicilin rezistentních forem představuje jeden z nejvýznamnějších patogenů v prostředí chovu hosp. zvířat. Jedná se o druh s běžným výskytem na pokožce zvířat i lidí, kmeny *S. aureus*/MRSA ovšem představují riziko infekce a mohou být příčinou nemocí a vážných zdravotních komplikací zvířat i lidí. Důležitým nástrojem pro redukci výskytu onemocnění způsobených MRSA je existence rychlé a spolehlivé diagnostiky, využitelné v klinické veterinární praxi. Metodika na principu qPCR nabízí moderní alternativu pro diagnostiku specifické formy kmenů MRSA, která v ČR prozatím není rutinně vyšetřována. Předností metody je rychlost, citlivost, reprodukovatelnost a možnost kvantifikace patogenů, je-li to žádoucí. Prezentovaná metodika obsahuje detailní popis návrhu metody, popis postupu a reakčního schématu, validaci základních parametrů metody a informace pro interpretaci výsledků analýzy.

Metodika má zcela jistě různorodé využití. Možno ji prezentovat jako součást nástrojů a postupů, sloužících ke kontrole mikrobiální kontaminace potravin, jejich bezpečnosti, nebo hygieny jejich výroby (zejména mléčné a masové výrobky). Potřebnost existence metodiky vyplývá z obecného zájmu společnosti. Metodiku lze uplatnit podobně jako jiné dílčí postupy metod na hodnocení mikrobiálních parametrů, akceptovaných např. v rámci plnění nařízení ES č. 852 o hygieně potravin, nebo nařízení ES č. 853 o hygieně potravin živočišného původu. Dle nařízení EU by měli výrobci potravin a provozovatelé potravinářských podniků při své činnosti dodržovat principy HACCP (systém kontroly kritických bodů výroby), součástí kterých je i uplatňování zásad správné výrobní a hygienické praxe. V případě potřeby kontroly kontaminace kmeny MRSA s genem *mecC* pak vzniká prostor pro aplikaci prezentované metody.

Jiné, velice významné uplatnění metodiky je prostředí humánní klinické diagnostiky. Kmeny MRSA jsou v současnosti významným patogenem člověka a např. v nemocničním prostředí jsou často značně rozšířeny, způsobují závažné infekce s komplikovaným procesem léčby. Podobně jako ve veterinární praxi, lékařská mikrobiální diagnostika v ČR prozatím standardně nekalkuluje s přítomností nové formy MRSA nesoucí gen *mecC*. Na základě recentně publikovaných epidemiologických studií je ovšem možno předpokládat, že takové kmeny se v ČR již vyskytují. V závislosti na použité diagnostické metodě tak analýzy mohou generovat falešně negativní výsledky přítomnosti MRSA, co může mít závažné následky pro úspěšnost stanovené terapie pacientů.

I když se zdá, že plošné zastoupení *mecC* MRSA u zvířat a lidí v Evropě je v průměru poměrně nízké, důkazem opodstatněnosti testování *mecC* při monitoringu MRSA jsou i některá recentní pozorování, kdy výskyt *mecC* MRSA byl nezanedbatelný (5,9 – 68,8 %), (Diaz *et al.*, 2016). Několik studií zjistilo, že frekvence výskytu *mecC* MRSA je vysoká u mléčného skotu, co naznačuje, že skot by mohl představovat rezervoár těchto kmenů (Garcia-Alvarez *et al.*, 2011). Jiné studie zjistili vysoký výskyt *mecC* MRSA u vysoké zvěře a u hlodavců ve Španělsku (Gomez *et al.*, 2015), nebo u domácích zvířat ve Švédsku (Unnerstad *et al.*, 2013). Opomenout nelze také skutečnost, že kmeny *mecC* MRSA již byly detekovány prakticky ve všech Evropských státech (Diaz *et al.*, 2016) a logicky možno očekávat jejich další šíření. I když je původ kmenů *mecC* MRSA nejasný, existují důkazy, že kontakt se zvířaty představuje jisté riziko pro zdraví člověka a že kmeny *mecC* MRSA mohou být šířeny mezi různými druhy (Paterson *et al.*, 2014). Důležitost zavedení odpovídající metody detekující *mecC* MRSA do rutinního provozu humánní mikrobiální diagnostiky ilustruje např. studie Garcia-Garrote *et al.*, (2014), která popisuje případ úmrtí pacienta na oddělení intenzivní péče v nemocnici ve Španělsku v důsledku sepse způsobené kmenem *mecC* MRSA.

Disponování spolehlivými nástroji identifikace *mecC* MRSA a kontinuální hodnocení jejich výskytu u zvířat a lidí je základem pro získání nových epidemiologických poznatků o této nové formě MRSA. Získané poznatky mohou být využity pro účinnou eliminaci kmenů, jakkoliv se jejich recentní výskyt u hospodářských zvířat a lidí jeví jako nízký.

V souhrnu možno konstatovat, že cílovou skupinu uživatelů metodiky představují kromě chovatelů hospodářských zvířat a zpracovatelů živočišných produktů, potravinářů, také komerční laboratoře se zaměřením na aplikovanou mikrobiologii a genetiku, kontrolní orgány, klinická veterinární a humánní diagnostika, výzkumné ústavy, vysoké školy apod.

V Ekonomické aspekty

Ekonomický přínos je součástí podpory účinné a spolehlivé mikrobiální diagnostiky používané ve veterinářství, s cílem podpory produkce zdravých živočišných produktů masného i mléčného průmyslu a zamezení šíření patogenních kmenů. Rychlá a spolehlivá klinická diagnostika je součástí účinné a správné terapie postižených zvířat a tím redukuje náklady na léčbu zvířat pro chovatele. Zvýšení kvality diagnostiky tak v konečném důsledku má pozitivní ekonomický dopad. Riziko pozitivního nálezu kmenů MRSA neplatí pouze pro prvovýrobce masa a mléka, ale také pro finální potravinové výrobky. Pozitivní nález patogenu pak pro potravinářské výrobce může znamenat citelné ekonomické ztráty.

Předpokládané ekonomické přínosy (v tis. Kč) vztahované na konkrétního uživatele: při vyloučení 0,05% syrového kravského mléka z dalšího zpracování vzhledem k mikrobiální kontaminaci představují roční ztráty pro daného uživatele částku cca 350 tis. Kč. V případě dalších komodit (maso, kozy a ovce) lze očekávat ekonomický přínos při eliminaci kontaminace cca 1 mil Kč za rok. Ekonomický přínos vyplývající z uplatnění metodiky je determinován frekvencí výskytu nové formy MRSA, která je v současnosti obecně považována za zřídka. Mnohé recentní studie v krajích EU ovšem upozorňují na nálezy chovů v prvovýrobě živočišných produktů s poměrně vysokým výskytem MRSA nesoucích *mecC*. V důsledku absence jednotného schématu mikrobiální diagnostiky MRSA, která by zahrnovala i vzácné formy MRSA, bohužel chybí spolehlivé údaje o výskytu této formy MRSA v ČR.

Předpokládané jiné přínosy: jinými přínosy jsou socioekonomické ztráty vzniklé v souvislosti s možným onemocněním u lidí. Stanovení konkrétního ekonomického přínosu je vzhledem k již zmiňovaným faktům (absence odpovídající diagnostiky, absence informací o výskytu MRSA nesoucích *mecC* u lidí) problematické.

Výše nákladů na analýzu je variabilní vzhledem k široké skupině možných uživatelů metodiky. Cena analýzy klesá s počtem testovaných vzorků. Důvodem je obchodní politika výrobců a distributorů chemikálií, použitých v metodice a rovněž cena práce v poměru k množství testovaných vzorků (analýza několika vzorků a desítek vzorků se příliš neliší časem, potřebným na vykonání analýzy). Cena analýzy závisí také na zvolených reagentech a chemikáliích, lze samozřejmě používat jakékoliv izolační kity nebo postupy pro izolaci DNA a lze používat qPCR mastermixy a plastik od různých výrobců. Cenu jedné analýzy na pracovišti s odpovídajícím vybavením odhadujeme na 250 – 350 Kč dle použité varianty qPCR (SYBR green versus sonda).

VI Seznam použité související literatury

- Aydiner A, Lüsebrink J, Schildgen V, Winterfeld I, Knüver O, Schwarz K, Messler S, Schildgen O, Mattner F, 2012: Comparison of two commercial PCR methods for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) screening in a tertiary care hospital. *PLoS One*, 7, 9: e43935.
- Barraud O, Laurent F, François B, Bes M, Vignon P, Ploy MC, 2013: Severe human bone infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* variant. *J Antimicrob Chemother*, 68, 2949–2950.
- Basset P, Prod'homme G, Senn L, Greub G, Blanc DS, 2013: Very low prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in western Switzerland. *J Hosp Infect*, 83: 257–9.
- Bode LGM., Wertheim HFL, Ja Kluytmans JW, Bogaers-Hofman D, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Roosendaal R, Troelstra A, Box ATA, Voss A, van Belkum A, Verbrugh HA, Vos MC, 2011: Sustained low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* upon admission to hospital in The Netherlands. *J Hosp Infect*, 79: 198–201.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-second Informational Supplement*. CLSI document M100-S22 (ISBN 1-56238-785-5 [Print]; ISBN 1-56238-786-3 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2012.
- Cuny C, Layer F, Strommenger B, Witte W, 2011: Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLoS One*, 6(9): e22360.
- Deplano A, Vandendriessche S, Nonhoff C, Denis O, 2014: Genetic diversity among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying the *mecC* gene in Belgium. *J Antimicrob Chemother*, 69: 1457–60.
- Dermota U, Zdovc I, Strumbelj I, Grmek-Kosnik I, Ribic H, Rupnik M, Golob M, Zajc U, Bes M, Laurent F, Mueller-Premru M, 2015: Detection of methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in human samples in Slovenia. *Epidemiol Infect*, 143: 1105–8.
- Diaz R, Ramalheira E, Afreixo V, Gago B, 2016: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the new *mecC* gene--a meta-analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 84(2): 135-40.
- Eriksson, J, Espinosa-Gongora C, Stamphøj I, Larsen AR, Guardabassi L, 2013: Carriage frequency, diversity and methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* in Danish small ruminants. *Vet Microbiol*, 163: 110–115.
- Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. 2011: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*, 11: 595–603.
- Garcia-Garrote F, Cercenado E, Marin M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, Ballesteros C, Pita J, Alonso P, Vindel A, 2014: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J Antimicrob Chemother*, 69: 45–50.
- Gindonis V, Taponen S, Myllyniemi AL, Pyorala S, Nykasenoja S, Salmenlinna S, Laura Lindholm L, Rantala M, 2013: Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. *Acta Vet Scand*, 13: 55:61.
- Gómez P, Gonzalez-Barrio D, Benito D, Garcia JT, Vinuela J, Zarazaga M, Ruiz-Fons F, Torres C, 2014: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in wild small mammals in Spain. *J Antimicrob Chemother*, 69: 2061–4.
- Gómez P, Lozano C, Gonzalez-Barrio D, ZarazagaM, Ruiz-Fons F, Torres C., 2015: High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in a semi-extensive red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) farm in Southern Spain. *Vet Microbiol*, 177: 326–31.
- Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, Gagnon F, Truchon K, Bastien M, Picard FJ, van Belkum A, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG, 2004: New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol*, 42: 1875–1884.
- Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de Lencastre H, Perreten V, Holden MT, Coleman DC, Goering R, Giffard PM, Skov RL, Zhang K, Westh H, O'Brien F, Tenover FC, Oliveira DC, Boyle-Vavra S, Laurent F, Kearns AM, Kreiswirth B, Ko KS, Grundmann H, Sollid JE, John JF Jr, Daum R, Soderquist B, Buist G, International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC), 2012: Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother*, 56: 4997–9.
- Kerschner H, Harrison EM, Hartl R, Holmes MA, Apfalter P., 2014: First report of *mecC* MRSA in human samples from Austria: molecular characteristics and clinical data. *New Microbes New Infect*, 3: 4–9.
- Kluytmans-van den Bergh MF, Vos MC, Diederens-Baast R, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Voss A, Kluytmans JW, Dutch Working Group on the Laboratory Detection of Highly

- Resistant Microorganisms., 2014: Dutch guideline on the laboratory detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis*, 33: 89–101.
- Köck R, Schaumburg F, Mellmann A, Köksal M, Jurk, A, Becker K, Friedrich AW, 2013: Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. *PLoS One*. 8, 2: e55040.
- Kriegeskorte A, Ballhausen B, Idelevich EA, Köck R, Friedrich AW, Karch H, Peters G, Becker K, 2012: Human MRSA isolates with novel genetic homolog, Germany. *Emerg Infect Dis*, 18: 1016–1018.
- Laurent F, Chardon H, Haenni M, Bes M, Reverdy ME, Madec JY, Lagier E, Vandenesch F, Tristan A, 2012: MRSA harboring *mecA* variant gene *mecC*, France. *Emerg Infect Dis*, 18: 1465–7.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 4: 402–408.
- Loncaric I, Küber-Heiss A, Posautz A, Stalder GL, Hoffmann D, Rosengarten R, Walzer C, 2013: Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. carrying the *mecC* gene, isolated from wildlife. *J Antimicrob Chemother*, 14: 2222–2225.
- Loncaric I, Küber-Heiss A, Posautz A, Stalder GL, Hoffmann D, Rosengarten R, 2014: *mecC*- and *mecA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from livestock sharing habitat with wildlife previously tested positive for *mecC*-positive MRSA. *Vet Dermatol*, 25: 147–8.
- Luteijn JM, Hubben GA, Pechlivanoglou P, Bonten MJ, Postma MJ, 2011: Diagnostic accuracy of culture-based and PCR-based detection tests for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*, 17, 2: 146–154.
- Manga I., 2011: *Identification and quantification of the S. aureus strains in the milk samples using the real-time PCR assay*. Applied certified method, 36 p., certified by the SVS ČR, 14.12.2011, reference number: SVS/6569/2011
- Manga I, Vyleťlová M, 2013: A new real-time PCR assay for rapid identification of the *S. aureus*/MRSA strains. *Acta Univ Agric Silvicae Mendel Brun*, 61 (6): 1785–1792.
- Medhus A, Slettebakk JS, Marstein L, Larssen KW, Sunde M, 2013: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the novel *mecC* gene variant isolated from a cat suffering from chronic conjunctivitis. *J Antimicrob Chemother*, 68: 968–969.
- Monecke S, Gavier-Widen D, Mattsson R, Rangstrup-Christensen L, Lazaris A, Coleman DC, Shore AC, Ehrlich R, 2013: Detection of *mecC*-positive *Staphylococcus aureus* (CC130-MRSA-XI) in diseased European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. *PLoS ONE*, 8, e66166.
- Nijhuis RH, van Maarseveen NM, van Hannen EJ, van Zwet AA, Mascini EM., 2014: A rapid and high-throughput screening approach for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on the combination of two different real-time PCR assays. *J Clin Microbiol*, 52(8): 2861-7.
- Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA., 2014: The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 22: 42–7.
- Paterson GK, Morgan FJ, Harrison EM, Cartwright EJ, Török ME, Zadoks RN, Parkhill J, Peacock SJ, Holmes MA, 2013a: Prevalence and characterisation of human *mecC*

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in England. *J Antimicrob Chemother.* <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt462>
- Paterson GK, Morgan FJE, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA, 2013b: Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *J Antimicrob Chemother.* <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt417>
- Paterson GK, Larsen AR, Robb A, Edwards GE, Pennycott TW, Foster G, Mot D, Hermans K, Baert K, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA, 2012: The newly described *mecA* homologue, *mecA*(LGA251), is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J Antimicrob Chemother*, 67: 2809–2813.
- Petersen A, Stegger M, Heltberg O, Christensen J, Zeuthen A, Knudsen LK, Urth T, Sorum M, Schouls L, Larsen J, Skov R, Larsen AR, 2013: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clin Microbiol Infect*, 19 (1): E16–22.
- Pichon B, Hill R, Laurent F, Larsen AR, Skov RL, Holmes M, Edwards GF, Teale C, Kearns AM, 2012: Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of nuc, Panton–Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecA*(LGA251). *J Antimicrob Chemother*, 67: 2338–2341.
- Porrero MC, Valverde A, Fernandez-Llario P, Diez-Guerrier A, Mateos A, Lavin S, Cantón R, Fernández-Garayzabal JF, Domínguez L, 2014: *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* gene in animals and urban wastewater, Spain. *Emerg Infect Dis*, 20 (5): 899–901.
- Rossney AS, Herra CM, Brennan GI, Morgan PM, O’Connell B, 2008: Evaluation of the Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay using the GeneXpert real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens. *J Clin Microbiol*, 46: 3285–3290.
- Sabat, AJ, Koksall M, Akkerboom V, Monecke S, Kriegeskorte A, Hendrix R, Ehricht R, Köck R, Becker K, Friedrich AW, 2012: Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains that carry a novel genetic homologue and important virulence determinants. *J Clin Microbiol*, 50: 3374–3377.
- Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O’Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC, 2011: Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 3765–3773.
- Schaumburg, F, Köck R, Mellmann A, Richter L, Hasenberg F, Kriegeskorte A, Friedrich AW, Gatermann S, Peters G, von Eiff C, Becker K, 2012: Population dynamics among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Germany during a 6-year period. *J Clin Microbiol*, 50: 3186–3192.
- Snyder JW, Munier GK, Johnson CL, 2010: Comparison of the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) PCR assay to culture by use of BBL CHROMagar MRSA for detection of MRSA in nasal surveillance cultures from intensive care unit patients. *J Clin Microbiol* 48: 1305–1309.

- Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, Laurent F, Teale C, Skov R, Larsen AR, 2012: Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA(LGA251)*. *Clin Microbiol Infect*, 18: 395–400.
- Tiemersma EW, Monnet DL, Bruinsma N, Skov R, Monen JCM, Grundmann H, 2005: *Staphylococcus aureus* bacteremia, Europe. *Emerg Infect Dis*, 11: 1798–1799.
- Unnerstad HE, Bengtsson B, Horn af Rantzien M, Borjesson S, 2013: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecC* in Swedish dairy cows. *Acta Vet Scand*, 55: 6.
- Vandendriessche S, Vanderhaeghen W, Soares FV, Hallin M, Catry B, Hermans K, Butaye P, Haesebrouck F, Struelens MJ, Denis O, 2013: Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by humans and animals across livestock production sectors. *J Antimicrob Chemother*, 68: 1510–1516.
- Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P, 2010a: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiol Infect*, 138: 606–625.
- Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P, 2010b: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet Microbiol*, 144: 166–171.
- van Duijkeren E, Jansen MD, Flemming SC, de Neeling H, Wagenaar JA, Schoormans AHW, van Nes A, Fluit AC, 2007: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. *Emerg Infect Dis*, 13: 1408–1410.
- van Duijkeren E, Hengeveld PD, Albers M, Pluister G, Jacobs P, Heres L, van de Giessen AW, 2014: Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* in dairy cattle. *Vet Microbiol*, 171: 364–7.
- Walther, B, Wieler LH, Vincze S, Antão EM, Brandenburg A, Stamm I, Kopp PA, Kohn B, Semmler T, Lübke-Becker A, 2012: MRSA variant in companion animals. *Emerg Infect Dis*, 18: 2017–2020.
- Weese JS, Van Duijkeren E, 2010: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol*, 140: 418–429.

VII Seznam publikací, které předcházely metodice

Publikace (Klimešová = Vyletělová):

- Klimešová M, Manga I, Nejeschlebová L, Horáček J, Ponížil A, Vondrušková E, 2016: Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cattle, sheep, goat and pig rearing in Czech Republic. *Acta Vet Brno*, v oponentním řízení.
- Manga I, Klimešová M, Horáček J, Koláčková I, Bjelková M, Ponížil A, Nejeschlebová L, 2015: Rep-PCR typing of *Staphylococcus spp.* strains in meat paste production line and identification of their origin. *Potravinarstvo*, 9 (1), 166-173, 2015, doi:10.5219/465, ISSN 1337-0960.
- Klimešová M, Horáček J, Ondřej M, Manga I, Koláčková I, Nejeschlebová L, Ponížil A, 2015: Microbial contamination of spices used in production of meat products. *Potravinarstvo*, 9 (1): 154-159. ISSN 1337-0960.

- Nejeschlebová H, Klimešová M, Karpíšková R, Hanuš O, Nejeschlebová L, 2015: Environmentální a kontagiózní mastitidní patogeny na mléčné farmě. *Náš chov*, LXXV, 7: 28-30. ISSN 0027-8068.
- Bogdanovičová K, Šťástková Z, Vyleťelová-Klimešová M, Karpíšková R, 2015: Výskyt enterotoxin-produkujících kmenů *Staphylococcus aureus* v mléce na území České republiky. *Veterinářství*, vol. 65, no. 7, p. 546-549.
- Koláčková I, Koukalová K, Klimešová M, Karpíšková R, 2014.: Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* v chovech prasat v České republice. *Náš chov*, no. 8, p. 86-87.
- Vyleťelová-Klimešová M, Hanuš O, Dufek A, Němečková I, Nejeschlebová L, Horáček J, Ponížil A, 2014: *Staphylococcus aureus* and other pathogens in relation to breed of cattle and somatic cell count. *Staphylococcus aureus* a ostatní patogeny ve vztahu k plemeni skotu a počet somatických buněk. *Bulg J Agric Sci*, 20 (6): 1495-1500. ISSN 1310-0351.
- Manga I, Vyleťelová M, 2013: A new real-time PCR assay for rapid identification of the *S. aureus*/MRSA strains. *Acta Universitatis Acta Univ Agric Silvic Mendel Brun*, 6, 1785 – 1792, ISSN 1211-8516.
- Klimešová M, Hanuš O, Nejeschlebová L, 2013: Prevalence methicilin rezistentních kmenů *S. aureus* (MRSA). *Mlékařské listy*, 24, 2013, s. LIII -LV.
- Vyleťelová-Klimešová M, Hanuš O, Hasoňová L, Roubal P, Manga I, Nejeschlebová L, 2013: Occurrence of mastitis pathogens in relation to somatic cells. *Acta Univ Agric Silvic Mendel Brun*, LXI, No. 5, pp. 1505–1511.
- Acta Univ Agric Silvic Mendel Brun*
- Manga I, Vyleťelová M, 2012: Rep-PCR-based typing as a tool for tracking of MRSA infection origin., 6, 251-256, ISSN 1211-8516.
- Vyleťelová M, Karpíšková R, Manga I, Hanuš O, Nejeschlebová L, Žák P, 2012: *Staphylococcus* spp. v bazénových vzorcích a na mléčných filtrech. *Náš chov*, 6: 56-58. ISSN 0027-8068.
- Vyleťelová M, Vlková H, Manga I, 2011: Occurrence and characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant coagulase-negative Staphylococci in raw milk manufacturing. *Czech J Food Sci*, 29, 11-16, ISSN 1212-1800, IF: 0.413
- Manga I, Vyleťelová M, 2011: Occurrence of antibiotic resistance at *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* and *S. chromogenes* in the environment of milk dairy farms. *Cattle Research*, 53, 4, 40-48, ISSN 0139-7265.
- Vyleťelová M, Manga I, Karpíšková R, Šťástková Z, 2011: Quality of the milk in the milk automat machines. *Cattle Research*, 3, 69-74, ISSN 0139-7265.

Uplatněné certifikované metodiky:

- Vyleťelová M, Manga I: Postup při kontrole výskytu bakterií rodu *Staphylococcus aureus* a jejich rezistentních kmenů u masného skotu a malých přežvýkavců, uplatněná certifikovaná metodika, osvědčení vydala SVS ČR, dne 10.12.2012, číslo osvědčení: SVS/1212/042870-G. Nmet (certifikovaná metodika)
- Manga I: Identification and quantification of the *S. aureus* strains in the milk samples using the real-time PCR assay. Applied certified method, 2011, 36 p., certified by the SVS ČR, 14.12.2011, reference number: SVS/6569/2011

Abstrakty z konferencí:

- Manga I, Vyletělová M, 2012: Comparison of the performance of two different newly designed real-time PCR assays applicable for *S. aureus*/ MRSA identification. In: Book of abstracts from the *Central European Symposium on Antimicrobials and Antimicrobial Resistance - CESAR 2012*, 23–26.9.2012, Primosten, Croatia, P24, ISBN 978-953-7778-04-0.
- Vyletělová M, Manga I, 2012: Livestock Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin Resistant Coagulase-negative *Staphylococci* in Raw Cow's Milk. In: Book of abstracts from the *International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections - ISSSI 2012*, 26–30.8.2012, Lyon, France.
- Manga I, Vyletělová M, 2012: The real-time PCR assay for rapid identification of MRSA strains in cow milk. In: Proceedings from the *SfAM Summer Conference 2012*, Edinburgh, Scotland, 2–5.7. 2012, P15.
- Manga I, Dufek A, Vyletělová M, Zhang Y, 2011: Occurrence of antibiotic resistance in *Staphylococcus spp.* at dairy farms with conventional and organic system and its evaluation with GLMM. In: Proceedings from the *MicroBiotec 2011 conference*, s 105, Braga, Portugal, 1.–3.12.2011, ISBN 978-989-97478-1-4.
- Manga I, Vyletělová M, Karpišková R, Šťásková Z, 2011: Typing of MRSA strains using different molecular-genetic methods. In: Proceedings from the *Microbiologia Balkanica 2011*, Beograd, Serbia, 25-29.10.2011.
- Manga I, Vyletělová M, Karpišková R, Šťásková Z, 2011: Molecular characterization of MRSA strains isolated from livestock milk and meat in the Czech Republic, In: Book of abstracts from the *SfAM Summer Conference*, Dublin, Ireland, 4–7.7. 2011, P85, 55-56.

VIII Ostatní

Dedikace na projekt

Metodika byla vypracována na základě experimentálních výsledků předkladatele za podpory projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS QJ1210284.

Odkaz na CM

<http://www.agritec.cz/cs/identifikace-kmenu-mrsa-nesoucich-gen-mecc-s-vyuzitim-metody-real-time-pcr>

Podíl autorů na tvorbě certifikované metodiky

Mgr. Ivan Manga, Ph.D. – 80 %

doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D. – 20 %

Jména oponentů a organizace, která vydala osvědčení

1) Odborník z daného oboru: prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie mléka, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno: vorloval@vfu.cz

2) Pracovník státní správy: MVDr. Jiří Hlaváček, SVS ČR, Slezská 7, 120 56 Praha 2: j.hlavacek@svscr.cz