

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Renáta Šafránková

2021

Doktorský studijní program
Lékařská mikrobiologie

Využití MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie i dalších metod při identifikaci mikroorganismů

**Using of MALDI-TOF mass spectrometry and other methods for identification of
microorganisms**

Mgr. Renáta Šafránková

Školitel: doc. MUDr. Helena Žemličková, Ph.D.

Hradec Králové, 2021

Prohlášení autora

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2021

Renáta Šafránková

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat především své školitelce doc. MUDr. Heleně Žemličkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc nejen s vypracováním této práce.

Poděkování patří i Mgr. Vladislavu Jakubů za odborné připomínky týkající se molekulárně biologických metod.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat pracovníkům České národní sbírky typových kultur a Národní referenční laboratoře pro antibiotika Státního zdravotního ústavu za pečlivou práci při přípravě vzorků.

Obsah

Souhrn	9
Summary	10
1. Úvod do problematiky - metody identifikace mikroorganismů v současnosti.	11
1.1. MALDI-TOF MS.....	12
1.1.1. Historie	12
1.1.2. Princip metody	12
1.1.3. Příprava vzorků.....	14
1.1.4. Analýza hmotnostních spekter.....	16
1.1.5. Identifikace mikrobiálních izolátů	17
1.1.6. Použitelnost MALDI-TOF MS	20
1.1.7. Úskalí metody a její citlivá místa	21
1.1.8. Výhody metody	22
1.2. Ostatní metody.	22
1.2.1. Klasické identifikační metody.....	23
1.2.1.1. Mikroskopie	23
1.2.1.2. Biochemické identifikační testy.....	24
1.2.1.3. Typizační techniky	24
1.2.2. Vybrané molekulárně biologické identifikační metody	24
1.2.2.1. DNA-DNA hybridizace (reasociace).	24
1.2.2.2. PCR (Polymerázová řetězová reakce).....	25
1.2.2.3. RFLP (Polymorfismus délky restrikčních fragmentů)	25
1.2.2.4. 16S rRNA analýza.....	26
1.2.2.5. Celogenomová sekvenace	26
1.3. Charakteristika studovaných agens	27
1.3.1. <i>Campylobacter</i> spp.....	27
1.3.2. <i>Plesiomonas shigelloides</i>	27
1.3.3. <i>Citrobacter</i> spp.	28
1.3.4. <i>Staphylococcus intermedius/S. pseudintermedius</i> (<i>S. intermedius</i> -group, SIG) .	28
1.3.5. <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (netyfové kmeny).....	28
2. Cíle disertační práce	29

3. Materiál	29
3.1. Kmeny	29
3.2. Kultivační média a kity	30
3.3. Ostatní materiál (matrice, primery, testy, séra)	30
4. Metody	32
5. Výsledky	34
6. Diskuse	45
7. Závěr	49
8. Seznam citací použité literatury	51
9. Přílohy	68

Seznam použitých zkratk

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CBA	krevní agar (Columbia Blood Agar)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNCTC	Česká národní sbírka typových kultur (Czech National Collection of Type Cultures)
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
DNA	kyselina deoxyribonukleová (Deoxyribonucleic Acid)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPIDAT	program k zajištění povinného hlášení, evidence a analýzy výskytu infekčních nemocí v České republice; od roku 2018 nahrazen programem ISIN (Informační systém infekčních nemocí)
ESBL	širokospektrá beta-laktamáza (Extended Spectrum Beta Lactamase)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FA	kyselina ferulová (Ferulic Acid)
FAME	analýza mastných kyselin (Fatty Acid Methyl Ester)
HCCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
HCOOH	kyselina mravenčí
ICMS	Intact Cell Mass Spectrometry
ITS	vnitřní přepisovaný mezerník (Internal Transcribed Spacer)
KCN	kyanid draselný
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (Minimum Inhibitory Concentration)

MRSA	Meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
NA	Nutrient Agar
NGS	Next-Generation Sequencing
NRL	Národní referenční laboratoř
PFGE	pulzní gelová elektroforéza (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	kyselina ribonukleová (Ribonucleic Acid)
SA	kyselina sinapová (Sinapic Acid)
SIG	Staphylococcus Intermedius Group
spp	species (druhy)
VRE	Vankomycin rezistentní enterokoky (Vankomycin-resistant Enterococci)
WGS	celogenomová sekvenace (Whole Genome Sequencing/Shotgun)

Souhrn

Úvod

Metoda MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie je relativně nová metoda identifikace mikroorganismů, založená na analýze části buněčného proteomu. V posledních letech prodělala prudký rozvoj a postupně doplnila a pak i částečně nahradila do té doby dlouhodobě ověřené rutinní biochemické metody. Stala se tak nedílnou součástí mnoha mikrobiologických laboratoří a s jejím rozšířením souvisí i včasné nasazení efektivní terapie a ve výsledku zkrácení doby léčby pacienta. V těch případech, kdy potřebujeme detailnější charakterizaci mikroorganismů, můžeme dnes využít celé spektrum dalších, především molekulárně-biologických metod, polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) počínaje, přes RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů), sekvenační analýzu amplikonů části genu pro 16S rRNA (16S rRNA), až po celogenomovou sekvenaci.

Cíl práce

Pomocí metody MALDI-TOF MS i jiných metod (PCR, RFLP, rozšířená biochemická identifikace) charakterizovat a/nebo reidentifikovat vybrané čtyři skupiny infekčních agens (*Campylobacter* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Citrobacter* spp., *Staphylococcus intermedius*/*Staphylococcus pseudintermedius*). Zvolená agens byla klasickými metodami identifikace (morfologie, mikroskopie, biochemické testy) testována v letech 1950-2015; hlavním cílem disertační práce bylo porovnat efektivitu původních a novějších metod. Poslední skupinu studovaných agens tvořily kmeny *Salmonella* spp., dalším úkolem bylo tyto kmeny zpracovat metodou MALDI-TOF MS, specifikovat sérovar a vyšetřit citlivost k vybraným antibiotikům.

Výsledky

Metoda MALDI-TOF MS se v porovnání s předchozími rutinními biochemickými metodami ukázala jako mnohem efektivnější u všech čtyř skupin vybraných agens (*Campylobacter* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Citrobacter* spp., *Staphylococcus intermedius*/*Staphylococcus pseudintermedius*).

Metoda PCR u kmenů *Campylobacter* spp. dosáhla srovnatelných výsledků jako MALDI-TOF MS, ale byla více pracná a časově náročnější. Rozšířená biochemická identifikace pomocí Farmerovy matice (*Citrobacter* spp.) se ukázala o něco méně účinná než MALDI-TOF MS. Metoda RFLP bezpečně rozlišila 2 skupiny kmenů velmi podobných druhů *Staphylococcus intermedius* a *Staphylococcus pseudintermedius*, které nebyly rozlišitelné biochemicky a/nebo ani MALDI-TOF MS. MALDI-TOF MS nebyla schopna rozlišit jednotlivé sérovary (*Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella* spp.). Byla zjištěna relativně nízká frekvence rezistence k vyšetřovaným antibiotikům u izolátů *Salmonella* spp.

Závěr

MALDI-TOF MS se ukázala jako velmi efektivní metoda v identifikaci mikroorganismů; při detailnějším zkoumání daného agens je však vhodné ji doplnit dle druhu příslušného mikroorganismu i dalšími technikami, např. molekulárně biologickými metodami (PCR, RFLP), rozšířenou biochemickou identifikací (Farmerova matice), sérotypizačními technikami.

Summary

Background

MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) method for identification of microorganisms appeared not long ago. It is based on analysis of cell proteome. The method has undergone rapid development recently and it gradually complemented or even substituted classical routine biochemical methods. It became highly important part of microbiological laboratories. An increase in its use contributed considerably to starting of effective therapies timely and resulted in shortening of time needed for medical care. Numerous laboratory techniques, that are available nowadays, can be applied for more detailed characterization of isolated microbes, when it is necessary. The molecular-biological methods are of the most importance, namely polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), 16S rRNA gene sequence analysis or whole gene sequencing (WGS) analysis.

Aims

Four particular groups of infectious agents (*Campylobacter* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Citrobacter* spp., *Staphylococcus intermedius/Staphylococcus pseudintermedius*) were described and/or reidentified by MALDI-TOF MS and other methods (PCR, RFLP, extended biochemical identification). These agents were identified using classic methods (morphology, microscopy, biochemical tests) in years 1950-2015. The major aim of these studies were to compare efficiency of original and recent methods. The last group of strains under study consisted of *Salmonella* spp., additional tasks were to process these strains with MALDI-TOF MS, specify serovars and examine susceptibility to selected antibiotics.

Results

The MALDI-TOF method appeared as more efficient than original routine methods for all four groups of selected agents (*Campylobacter* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Citrobacter* spp., *Staphylococcus intermedius/Staphylococcus pseudintermedius*). The PCR method achieved analogous results as MALDI-TOF when applied to *Campylobacter* spp., but it was more complicated and time consuming. Extended biochemical identification using Farmer matrix appeared less efficient than MALDI-TOF for *Citrobacter* spp. The RFLP method reliably differentiated two groups of very closely related species *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus pseudintermedius* which could not be differentiated neither by biochemical methods nor by MALDI-TOF. MALDI-TOF MS could not distinguish between particular serovars (*Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella* spp.). The resistance to selected antibiotics occurred relatively rarely in the group of *Salmonella* spp. isolates.

Conclusion

MALDI-TOF proved to be very efficient method for the identification of microorganisms, more detailed investigation of infection agents should be complemented by other methods according to particular species, such as molecular biology techniques (PCR, RFLP), extended biochemical identification (Farmers matrix) or serotyping.

1. Úvod do problematiky - metody identifikace mikroorganismů v současnosti.

Detailní charakterizace mikroorganismů včetně identifikace je důležitá nejen z hlediska jejich klasifikace a taxonomie, ale je nezastupitelná i v mnoha dalších odvětvích našeho života se speciálním důrazem na oblast zdravotnictví, kdy přesné a rychlé určení původce daného infekčního onemocnění s následným vyšetřením citlivosti k antimikrobním látkám je nezbytným podkladem pro účinnou a adekvátní léčbu. Na stranu druhou, a zvláště pak u některých skupin nemocných, může mít nesprávně provedený či protražovaný průkaz etiologického agens i fatální důsledky.

Při identifikaci mikroorganismů, tj. při popisu jejich genetických a metabolických vlastností, jsou nyní používány metody, které se již dříve osvědčily v molekulární biologii (např. metody odvozené od PCR), imunologii (ELISA, imunofluorescenční metody, atd.) a biochemii (např. měření enzymových aktivit) a metody fyzikálně-chemické (např. spektrometrie).

Metody identifikace/charakterizace mikroorganismů v současnosti:

- klasické metody (fenotypové): morfologie, kultivace, mikroskopie (světelná, fluorescenční, elektronová), biochemické testy včetně komerčních mikrotestů (např. systém API, Vitek, MicroScan, Biolog). Tyto metody se používají dodnes, některé spíše jako doplňkové a/nebo ve speciálních případech (dourčení kmene, detailní biochemická identifikace, dourčení sérovaru atd).
- MALDI-TOF MS – moderní, spolehlivá metoda k rychlé a přesné identifikaci mikroorganismů, je řazena mezi proteomické metody (1)
- genotypové metody - molekulárně biologické metody: DNA-DNA hybridizace, metody založené na amplifikaci nukleových kyselin - PCR, multiplex PCR, real time-PCR (rt-PCR), sekvenační analýza 16S rRNA, celogenomová sekvenace WGS a mnoho dalších.
- typizační metody – sérotypizace, fagotypizace, PFGE (podrobná charakterizace kmenů na úroveň sérotypů, fagotypů a epidemiologicky významných kmenů)
- imunologické metody – ELISA, ELFA, imunochromatografie
- další metody: FAME (analýza mastných kyselin), analýza mykolových kyselin, Ramanova spektrometrie

1.1. MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight, mass spectrometry) = ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu je původně fyzikálně-chemická metoda, která byla zpočátku vyvinuta pro analýzu peptidů a proteinů.

1.1.1. Historie

První zmínka o použití hmotnostní spektrometrie pro charakterizaci mikroorganismů resp. bakterií pochází již z roku 1975 (kombinace pyrolýzy a hmotnostní spektrometrie)(2). V 80. letech minulého století zhruba ve stejnou dobu dva vědecké týmy ohlásili metodu „měkké“ (soft) desorpce ionizace laserem (tvrdá ionizace je např. proud elektronů). V Německu se touto problematikou zabývali Franz Hillenkamp a Michael Karas, kteří jako ochranu proteinů před poškozením laserem použili tzv. matrici, v tomto případě organickou sloučeninu (3); v Japonsku Koichi Tanaka jako matrici použil ultrajemný kovový prášek a glycerol, za což mu byla v roce 2002 udělena Nobelova cena (4, 5).

V roce 1986 byla jako matrice využita dnes hojně využívaná kyselina skořicová resp. její deriváty (6), v roce 1991 kyselina 2,5 dihydroxybenzoová (7).

V roce 1996 byla metoda MALDI-TOF MS poprvé využita pro identifikaci, nejprve byla získána velmi nekvalitní spektra a metoda se jevila jako obtížně reprodukovatelná a využití této metody se předpokládalo spíše ve výzkumu (8). Současně byla vyvinuta metoda pro identifikaci bakterií na základě srovnání referenčního a hmotnostního spektra vzorků pomocí biomarkerů s vysokou intenzitou proteinů společných pro rod a druh (9, 10).

Do klinické praxe se tato metoda dostala před více než 10 lety a způsobila doslova převrat v identifikaci mikroorganismů v rutinních mikrobiologických laboratořích (11, 12).

1.1.2. Princip metody

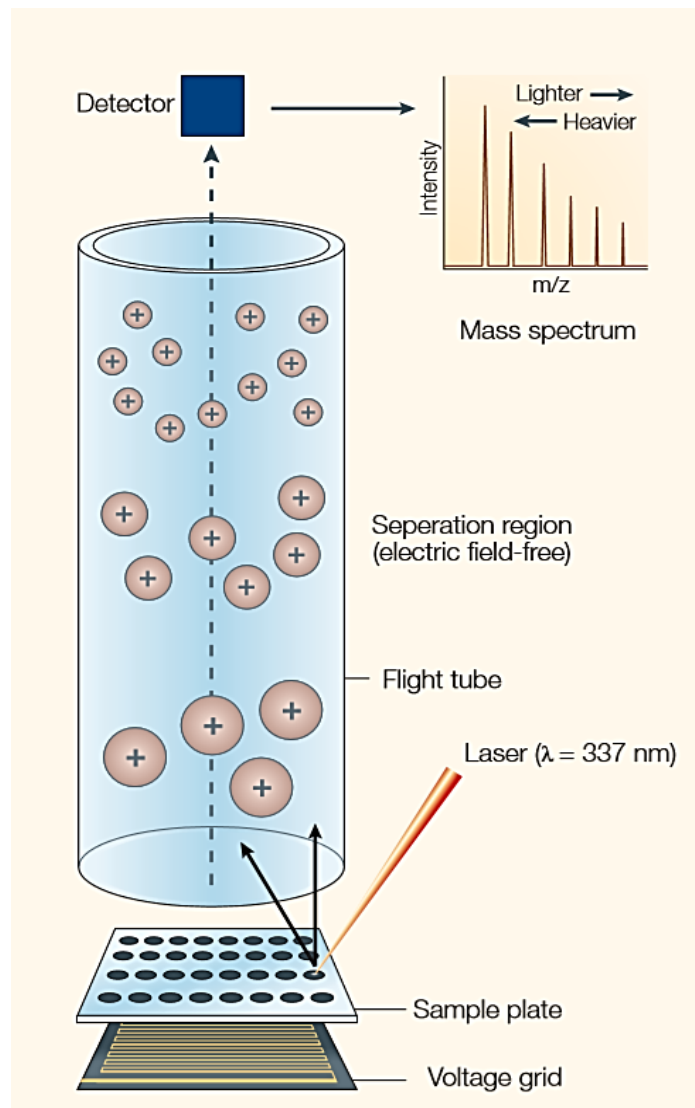
Základem metody je ionizace (vzorku) pomocí laseru resp. laserového pulsu za přítomnosti matrice (často kyselina skořicová) a současná desorpce (uvolnění iontů vzorku), to vše ve spojení s detektorem doby letu, který zaznamenává průchod iontů. Molekuly zkoumaného vzorku nejsou štěpeny, ale ionizovány, přičemž ionty mohou být dále degradovány, spektrum takto vznikajících iontů o různé hmotnosti je analyzováno.

V případě metody MALDI-TOF MS jsou ionty generovány bombardováním vzorku s příslušnou maticí fotony z odpovídajícího zdroje záření, nejčastěji pulzního UV laseru (ve většině případů je používán N₂ laser s vlnovou délkou záření $\lambda = 337$ nm a typickou frekvencí 20–50 Hz); ionty jsou při detekci separovány podle hmotnosti (přesněji m/z , m = hmotnost, z = náboj) tj. podle rozdílné rychlosti pohybu, nabitě molekuly dorazí k detektoru doby letu v různých časech na základě jejich hmotností - lehčí molekuly létají rychleji, tj. dorazí k detektoru dříve než těžší molekuly, (viz obr. 1a,b). Signály jsou matematicky zpracovány a interpretovány (13). Pro identifikaci mikroorganismů jsou důležité ribosomální proteiny poskytující charakteristický profil vznikajících iontů a dostatečnou intenzitu signálů (14), které tvoří až 21% celkového proteinového obsahu buňky (15).



Obrázek 1a. Přístroj MALDI-TOF MS microflex™ Bruker Daltonic (SZÚ, Praha)

Obrázek 1b. Princip MALDI-TOF MS (podle 16)



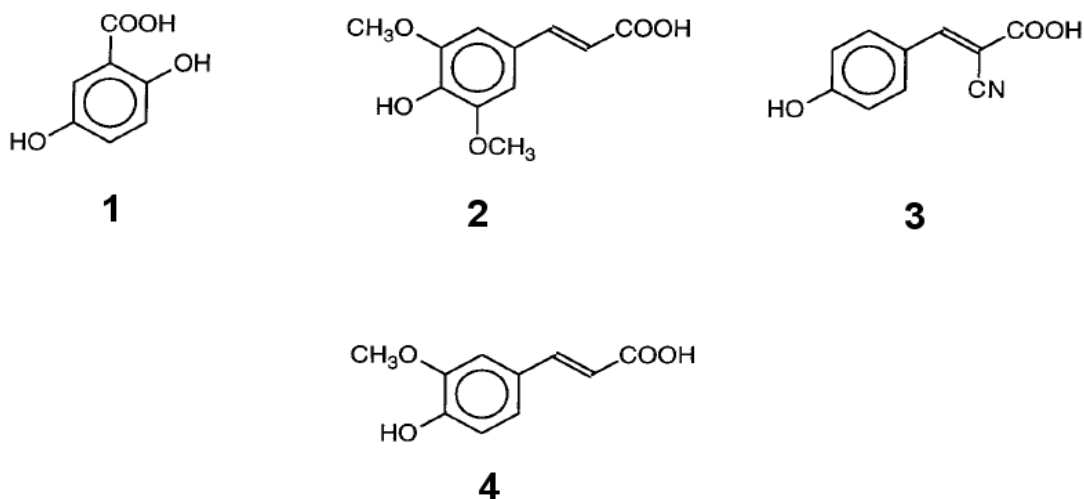
1.1.3. Příprava vzorků

Původní postupy předpokládaly izolaci buněčných frakcí a jejich následnou analýzu. V současnosti je metoda natolik zdokonalena, že umožňuje získávání celobuněčných spekter, (Intact Cell Mass Spectrometry, ICMS) kdy je na MALDI destičku z nerezové oceli deponována přímo bakteriální kultura z kultivačního media překrytá následně organickou matricí (7, 8).

Metoda přímá je vhodná pro většinu bakterií (Prokaryota) a případně pro kvasinky. Výchozím materiálem je standardně narostlá bakteriální kultura (18–24 h, u pomalu

rostoucích kolonií za 48 h). Vlastní příprava vzorku spočívá v nanesení (tj. rozetření) kultury na destičku (stačí jen velmi malé množství) a z následného překrytí malým množstvím organické matrice (zpravidla 1 μ l). Většinou se jako matrice používají organické kyseliny – 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DBH), kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (SA, kyselina sinapová), α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA), 3-methoxy-4-hydroxyskořicová (FA, kyselina ferulová), viz obr. 2. Po zaschnutí je vzorek připraven k identifikaci, tj. je možno destičku vložit do přístroje a měřit MS spektrum. Matrice absorbuje většinu dopadající energie a směs se vzorkem je převedena do plynného stavu, v němž dochází k přenosu náboje mezi matricí a vzorkem a vzniku iontů. Typickými produkty ionizace jsou jednou protonizované molekuly, zatímco vícenásobně protonizované molekuly a klastry se běžně vyskytují s intenzitou o několik řádů nižší. Vzhledem k jednoduché protonizaci se vyskytují intenzivně ionty s vysokým poměrem m/z ; při detekci mikroorganismů jsou využívány oblasti m/z 10^3 – 10^4 Da (13).

Obrázek 2. Strukturální vzorce nejčastěji používaných matric v hmotnostní spektrometrii (1-DBH, 2-SA, 3-HCCA, 4-FA)



Technika přípravy vzorku na destičce (obr. 3) musí odpovídat technice použité při měření referenčních spekter; v opačném případě mohou vymizet některé charakteristické signály. Pro získání těchto signálů je třeba dodržovat standardní podmínky od kultivace vzorku až po finální měření spektra.

Obrázek 3. Destička na fixaci vzorku při MALDI-TOF MS (MALDI target plate), 96 pozic (spotů)



Pro Gram pozitivní bakterie příp. kvasinky s ohledem na odlišnou stavbu buněčné stěny je možné využít metody přímé s mezikrokem s kyselinou mravenčí (HCOOH), která naruší buněčnou strukturu. Metoda je někdy laicky nazývána jako „semiextrakční“ metoda. Postup je stejný jako u přímé metody, před překrytím matricí se na vzorek na destičce nanese 0,7 μ l 70% kyseliny mravenčí (17).

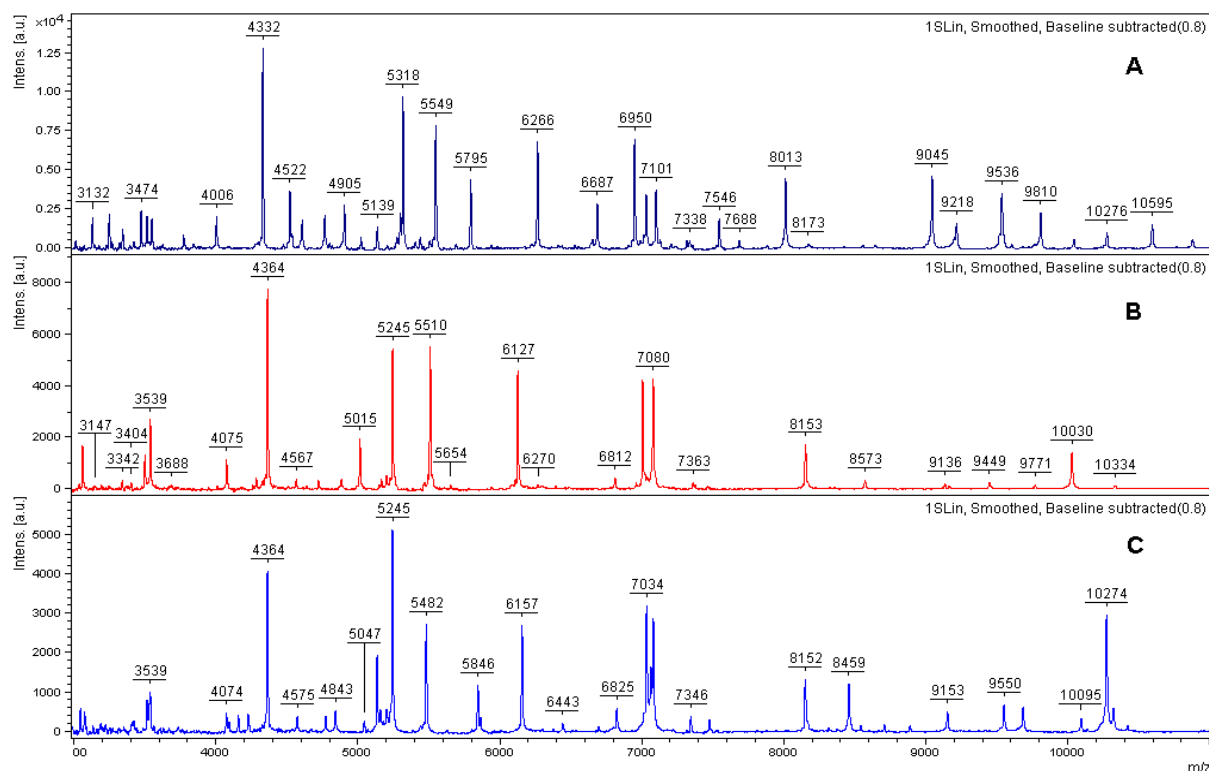
Metoda extrakční, založená na proteinových extraktech, je vhodná pro mykobakterie, některé Gram pozitivní bakterie (např. aktinomycety nebo korynebakterie), kvasinky a vláknité houby (18, 19, 20, 21). Při extrakci intracelulárních proteinů se používá především etanol a 70% kyselina mravenčí.

Pro vláknité houby je doporučena kultivace kmenů v tekutém médiu ve zkumavkách, které jsou umístěny v rotátoru či ve třepačce a následné provedení extrakční metody (22).

1.1.4. Analýza hmotnostních spekter

V minulosti bylo získání hmotnostních spekter pro vytvoření databáze značně komplikované a zahrnovalo mnoho matematických operací (13). V současnosti je matematické zpracování signálu pro účely diagnostiky plně automatizováno a výsledkem je charakteristické spektrum, které se porovnává s databází (obr. 4).

Obrázek 4. Příklad hmotnostních spekter tří různých druhů rodu *Campylobacter* (A. *C. hyointestinalis* CNCTC 7378^T; B. *C. coli* CNCTC 7377^T; C. *C. jejuni* susp. *jejuni* CNCTC 7365^T)



1.1.5. Identifikace mikrobiálních izolátů

Zdrojem signálů jsou lipopeptidy, peptidy, proteiny a oligonukleotidy; nejvyšší intenzitu vykazují ribozomální proteiny, event. proteiny buněčných stěn. Výsledkem je charakteristické spektrum, umožňující určení daného druhu. V řadě případů lze v takto získaných spektrech identifikovat specifické biomarkery umožňující subspeciaci v rámci daného druhu.

Vlastní identifikace pak probíhá porovnáním biomarkerových signálů s databází spekter (tzv. knihovnou spekter), hodnota skóre udává míru pravděpodobnosti správné identifikace zkoumaného vzorku/izolátu a je vyjádřena číselnou hodnotou, viz tabulka 1.

Tabulka 1. Vyhodnocení identifikace dle hodnoty skóre MALDI-TOF MS

Rozsah skóre	Popis	Označení	Barva
2.300 ... 3.000	vysoce pravděpodobná identifikace do druhu	(+++)	zelená
2.000 ... 2.299	vysoce pravděpodobná identifikace do rodu, pravděpodobná identifikace do druhu	(++)	zelená
1.700 ... 1.999	pravděpodobná identifikace do rodu	(+)	žlutá
0.000 ... 1.699	nespolehlivá identifikace	(-)	červená

- Identifikace Gram negativních bakterií z řádu Enterobacterales metodou MALDI-TOF MS je zpravidla velice spolehlivá a přesná bez speciálních extrakčních metod (23, 24). U nefermentujících gramnegativních tyčinek se zvýšila přesnost identifikace z původních 65 % na úroveň druhu (24) na téměř 83 % (25).
- Gram pozitivní bakterie: MALDI-TOF MS umožňuje identifikaci všech stafylokoků izolovaných v klinické praxi v souvislosti s humánními infekcemi, takže použití známých testů, jako je například volná nebo vázaná koaguláza, již není zpravidla nutné (26). Beta-hemolytické streptokoky jsou identifikovány relativně snadno, zatímco rozlišení viridujících streptokoků a pneumokoků je problematictější (27,28). Bylo zjištěno, že se vyskytují problémy především s rozlišením kmenů *Streptococcus pneumoniae* od streptokoků viridans patřících do skupiny *Mitis*. Většina studií prokázala, že tyto problémy mohou být překonány rozšířením databáze o další spektra obtížněji rozlišitelných druhů streptokoků (27, 28, 29). Grampozitivní bacily a aktinobakterie, včetně identifikace druhů rodu *Mycobacterium*, představují další oblast velkého úspěchu aplikace MALDI-TOF MS (26). Studie autorů Jadhav *et al.* (30) hodnotila spolehlivost identifikace souboru izolátů *Listeria monocytogenes* kultivovaných na různých typech médií. Spolehlivé identifikace na rodové resp. druhové úrovni bylo dosaženo u většiny izolátů (30).
- Identifikace anaerobních bakterií pomocí biochemických metod je obtížná. Studie Handala *et al.* (31) byla zaměřena na vyhodnocení spolehlivosti identifikace pomocí MALDI-TOF MS ve srovnání s 16S rRNA sekvenováním nejběžnějších klinicky

relevantních anaerobních bakterií, včetně *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp. a Gram pozitivních anaerobních koků. Autoři uvedli, že metoda MALDI TOF MS správně identifikovala asi 95 % anaerobů na úroveň rodu a 87 % na druhovou úroveň, s chybami identifikace hlavně mezi non-fragilis *Bacteroides* spp. a Gram pozitivními anaerobními koky. MALDI-TOF MS se obecně ukázala jako úspěšný způsob pro identifikaci anaerobů (31, 32, 33).

- Rod *Candida*: V rozsáhlé studii byla MALDI-TOF MS využita k charakterizaci izolátů rodu *Candida* z různých klinických materiálů s velmi dobrým výsledkem (26), metoda MALDI-TOF MS byla velmi úspěšná při identifikaci kvasinek z vulvovaginitid (35).
- Identifikace mikromycet: V mnoha klinických laboratořích je identifikace kvasinek a vláknitých hub stále závislá na fenotypových nebo molekulárních metodách, které jsou časově náročné, náročné na práci a někdy neúčinné (36, 37). Metoda MALDI-TOF MS byla pro rutinní mykologickou diagnostiku zejména vláknitých hub přijímána jen velmi pomalu (38). Nicméně nedávná studie Walkové *et al.* (22) na dermatofytech prokázala, že výsledky identifikace metodou MALDI-TOF MS převyšují úspěšnost konvenční morfologické (fenotypové) metody. Nejspolehlivější metodou identifikace u vláknitých hub zůstávají však molekulárně genetické metody - sekvenace tzv. vnitřních prepisovaných mezerníků (ITS) oblasti rDNA (38); tyto metody jsou ale ekonomicky nákladné a náročné na provedení, a tudíž nejsou na rozdíl od metody MALDI-TOF MS ve většině klinických laboratoří běžně dostupné (22).
- Identifikace virů je obtížnější než např. u bakterií. Virových proteinů vhodných pro identifikaci je méně a dosažení jejich dostatečného množství vyžaduje kultivování *in vitro* na specifických buněčných liniích. Tento postup zvyšuje riziko, že výsledná směs proteinů může být kontaminována jak proteiny z buněk při kultivaci, tak event. kontaminanty z okolí. Navíc takový postup vyžaduje mnohem více práce, času a zvyšuje cenu identifikací. Jednou z dalších překážek je molární hmotnost virových proteinů (často více než 20 kDa), které se tak svým rozpětím vymykají běžnému rozsahu molárních hmotností v MALDI Biotyperu. Přes uvedené obtíže jsou různé přístupy pro identifikaci virů metodou MALDI-TOF MS už řadu let testovány (39, 40, 41, 42, 43). Teprve v posledních letech se však podařilo tuto metodu uvést na takovou úroveň, aby mohlo být uvažováno o jejím využití v laboratorní praxi klinické virologie (44, 45, 46). Zcela recentní jsou výsledky naznačující, že by tato technika mohla využita při

detekování přítomnosti SARS-CoV2 (47). Nicméně, rutinní identifikace virů metodou MALDI-TOF MS je však stále otázkou budoucnosti (48).

1.1.6. Použitelnost MALDI-TOF MS

Celosvětově se kromě MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) používají komerční systémy Andromas (Andromas, Paříž, Francie), Saramis/Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francie) (30, 22). Pro rutinní mikrobiologii jsou k dispozici dva hlavní nástroje MALDI-TOF MS - MS Bruker Daltonics a Shimadzu (49).

V databázi spekter přístroje Bruker MALDI Biotyper je aktuálně okolo 7000 položek (Prokaryota i Eucaryota), z toho je přibližně 800 Eukaryot (převážně kvasinky a vláknité houby), součástí knihovny může být speciální SR databáze (Security Relevant Library) obsahující profily spekter biologických činitelů skupiny 3, jako jsou např. *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Francisella tularensis*, *Salmonella Typhi*, *Shigella dysenteriae* Typ 1, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*.

Rychlost a spolehlivost identifikace je zvláště potřebná při akutních případech v klinické mikrobiologii, např. možnost rychlé identifikace při pozitivní hemokultivaci a zajištění adekvátní antibiotické terapie (50) a ve výsledku zkrácení doby pobytu v nemocnici a snížení nákladů na hospitalizaci (51). Rychlá identifikace zvláště nebezpečných mikroorganismů také představuje účinný nástroj v boji proti bioterorizmu (52).

V posledních cca 10 letech je MALDI-TOF MS metoda testována jako nástroj pro určování rezistence vůči antibiotikům a také markerů rezistence u bakterií (53, 54). V současnosti je využívána k průkazu karbapenemázové aktivity u enterobakterií (resp. Gram negativních bakterií produkující karbapenemázy) (55), kdy se zjišťuje přítomnost specifických vrcholů vzniklých při rozštěpení antibiotika meropenemu. Přítomnost/nepřítomnost těchto vrcholů pak indikuje produkci/absenci enzymů – karbapenemáz ve vyšetřovaném kmeni. Rezistentní kmeny několika často se vyskytujících patogenů byly detegovány po modifikacích metody: simultánní detekce charakteristických m/z vrcholů MALDI-TOF MS u rezistentního ve srovnání s profilem susceptibilního/citlivého kmene (56) nebo stanovení rozdílů v růstové rychlosti bakterie při kultivaci za přítomnosti testovaného antibiotika a bez něj (57) rozlišily

oba typy kmenů. Stanovení dalších rezistentních bakterií, resp. dalších typů rezistence, pomocí MALDI-TOF MS na základě jejich specifických markerů (MRSA, VRE, rezistence ke kolistinu) v rutinní diagnostice je zatím ve výhledu, v současnosti je omezeno spíše na lokální epidemiologické účely (58, 59, 60).

1.1.7. Úskalí metody a její limity

Při kultivaci je doporučeno používat vždy stejné médium a stejné růstové podmínky, nicméně všechny tyto podmínky vykazují jen velmi malé variace vzhledem k typům signálů – téměř všechny píky jsou reprodukovatelné. Jestliže jsou Petriho misky s kmeny skladovány okolo 4°C, kvalita spekter se zhoršuje (během několika dní), vhodnější je uložení při laboratorní teplotě, ale vždy je nutno preferovat materiál čerstvý.

Správné identifikace nelze dosáhnout, pokud je vzorek směsný (61) nebo poskytované signály nejsou dostatečně rozdílné, tj. studované kmeny mají velmi podobný proteom; v extrémním případě není identifikace možná, např. absence rozlišení různých druhů shigel od druhu *E. coli*. Jejím důvodem je genetická shoda obou dříve ustanovených druhů, neboť molekulárně genetické analýzy prokázaly, že se jedná o jeden mikroorganismus (62). Pro účely klinické a epidemiologické stále rozlišujeme čtyři druhy rodu *Shigella* a *E. coli*; rozlišení těchto agens (*E. coli* x *Shigella* spp.) pomocí MALDI-TOF MS je ve zvláštních případech možné, ale pouze při použití pokročilého softwarového nástroje (63).

Na MALDI-TOF destičku je třeba nanášet velmi malé množství kultury, aby nedošlo k zahlcení detektoru. Někdy je problém se suchými, rozpadavými koloniemi, které špatně přilnou k povrchu destičky a nelze je rovnoměrně rozprostřít po celém spotu (viz. obr. 3). Obtíže se mohou vyskytnout i s koloniemi mukózními, které obsahují velké množství polysacharidů, které pak při měření interferují s vlastními proteiny zkoumaného mikroorganismu.

K úskalím této metody lze přiřadit i problematiku rozpoznání sérotypů u některých Gram negativních bakterií, na jejichž povrchu se nacházejí antigenní polysacharidové struktury, např. u řádu Enterobacterales - typicky salmonely, *E. coli*, u čeledi Vibrionaceae aj.; podle těchto struktur rozlišujeme druhy do tzv. sérotypů. Metodou MALDI-TOF MS zatím není

možné jednotlivé sérotypy od sebe odlišit (64). Zhoršená rozlišovací schopnost může být v tomto případě vysvětlena vyšší účinností této metody při získávání charakteristických píků m/z pro proteinové buněčné složky (především ribozomální proteiny) než pro jiné, např. sacharidové nebo lipidové biomolekuly.

1.1.8. Výhody metody

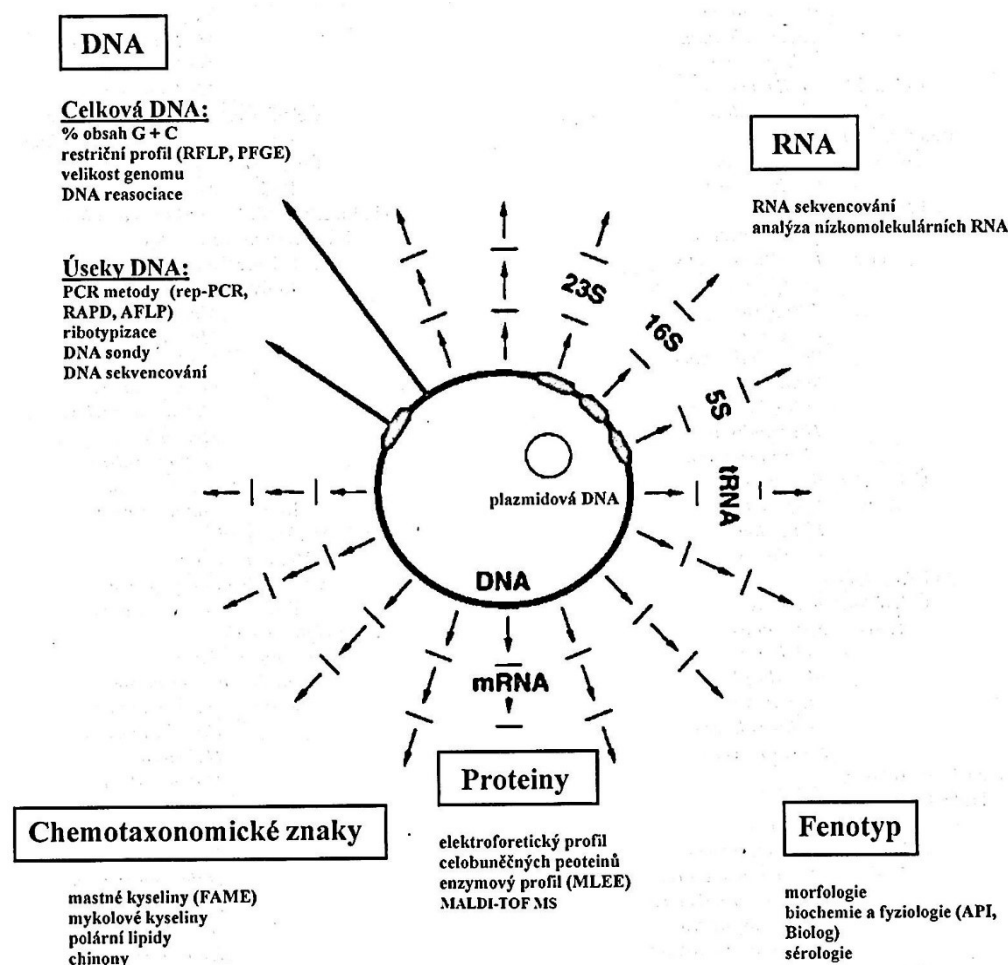
Metoda MALDI-TOF MS nachází zejména v posledních letech oblibu u stále se rozšiřující uživatelské základny, kde oceňována pro celou škálu nesporných výhod:

- a) velmi rychlá identifikace mikroorganismů řádově v minutách až desítkách minut, metoda nevyžaduje při identifikaci žádné předběžné testování, tj. barvení dle Grama, oxidázové, katalázové testy apod., ani návrh a výběr specifických reaktantů (např. primerů v případě PCR);
- b) vysoká citlivost – stačí velmi malé množství kultury
- c) vysoká spolehlivost identifikace při použití dostatečně robustní databáze, rozlišení i mezi příbuznými druhy;
- d) číselné vyjádření přesnosti identifikace (tzv. skóre)
- e) nízká cena měření (odhlédneme-li od pořizovací ceny přístroje).

1.2. Ostatní metody identifikace mikroorganismů.

Souhrn ostatních metod znázorňuje obrázek 5; kombinaci různých laboratorních technik při identifikaci nazýváme polyfázová taxonomie (66), tj. taxonomie založená na kombinaci údajů získaných různými technikami identifikace a využívající fenotypové, genotypové i fylogenetické informace (65). Tento polyfázový přístup je nyní obecně rozšířený při popisu nových mikroorganismů a také dříve popsané organismy jsou nyní reklasifikovány a znovu zařazeny do správných taxonů (67).

Obrázek 5. Metody identifikace mikroorganismů (upraveno podle 65, 66)



1.2.1. Klasické identifikační metody

1.2.1.1. Mikroskopie

Mikroskopický preparát poskytuje prvotní informaci při identifikaci bakterií na základě morfologie zkoumaného mikroorganismu daného Gramovým barvením. Barvení dle Grama je v bakteriologii zcela zásadní. Bakterie se diferencují na Gram negativní a Gram pozitivní (příp. Gram labilní) a dle tvaru na tyčinky (zahnuté, rovné, kyjovité), koky, spirály, vlákna, případně uspořádání do dvojic, shluků, řetízků aj.

Další techniky barvení jsou - barvení dle Ziehl-Neelsena (barvení acidorezistentních mikrobů) pro rod *Mycobacterium*, Giemsovo barvení – např. průkaz malárie, barvení chlamydií, mykoplazmat aj, tušová metoda dle Burriho – znázornění pouzder některých

bakterií či kryptokoků a další. Nativní preparáty se v bakteriologii využívají pouze výjimečně, např. u listerií (sledování motility) nebo u treponemat, fluorescenční mikroskopie se používá např. při sledování mykotických hyf. Elektronová mikroskopie se využívá především k průkazu virů.

1.2.1.2. Biochemické identifikační testy

Je detekována metabolická aktivita dané bakterie na určitém substrátu (ve zkumavce či mikrozksamavce) a sledován výsledný produkt metabolismu. Ten je zpravidla vyjádřen barevnou změnou média za přítomnosti indikátoru. Odtud i hovorový název „pestrá řada“.

Souhrn biochemických testů a jejich přepokládaných výsledků pro jednotlivé druhy z řádu Enterobacterales je uveden v tzv. Farmerově matici (68).

1.2.1.3. Typizační techniky

Zkoumaný mikroorganismus můžeme charakterizovat i na vnitrodruhové úrovni. Dodnes široce využívanou technikou je sérotypizace, kdy je aglutinační metodou zjišťován sérotyp/sérovar daného kmene; jedná se o reakci antigenu přítomného na povrchu mikroorganismu a protilátky (sérum), běžné u zástupců řádu Enterobacterales (rody *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, druh *E. coli* a další). Jiným druhem sérotypizace je tzv. Quellung reakce (Neufeldova reakce) – bobtnání bakteriálních pouzder v přítomnosti specifického antiséra, typicky u druhu *Streptococcus pneumoniae*. Další typizační technikou je fagotypizace, rozlišení vyšetřovaných kmenů pomocí jejich různé citlivosti vůči specifickým bakteriofágům. Tato technika se dnes využívá spíše okrajově nebo pro speciální účely.

1.2.2. Vybrané molekulárně biologické identifikační metody

1.2.2.1. DNA-DNA hybridizace (reasociace).

Dvoušroubovice DNA známého druhu (dsDNA = double stranded DNA) je denaturována (nejčastěji teplotou), dojde k rozpojení obou řetězců (ssDNA single stranded) a následně je reasociována s DNA neznámého druhu a vznikne tzv. heteroduplexů. Čím hůře se

heteroduplexy tvoří (či naopak, čím snáze se heteroduplexy disociují), tím menší je míra genetické příbuznosti u obou zkoumaných organismů (69). Dnes je tato metoda využívána v některých komerčních kitech založených na hybridizačních metodách (např. <https://www.micro-ident.de/en/products/technology/>).

1.2.2.2. PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Metoda rychlého namnožení neboli amplifikace požadovaného úseku DNA *in vitro* za vzniku tzv. amplikonů. Velkým benefitem je zejména to, že množství původní DNA může být extrémně malé, což je výhodné zejména u starších vzorků z krve, spermatu, chlupů, vlasů, u muzejního materiálu a podobně. Velmi důležitý je výběr primerů (= krátký úsek DNA neboli oligonukleotid) nezbytných pro zahájení i pro ukončení syntézy DNA. Výsledkem je velké množství kopií původní sekvence DNA. Analýzu výsledných fragmentů provádíme zpravidla na agarozovém gelu.

Objev metody PCR znamenal revoluci v molekulární biologii, neboť do určité míry jí využívá většina pokročilejších molekulárně genetických metod. Metoda byla hypoteticky popsána již v roce 1971 (70), objev PCR je obecně připisován K. Mullisovi (71), který za objev PCR získal v roce 1993 Nobelovu cenu (72).

Modifikací je metoda Real Time PCR, při které se zjišťuje množství produktu v reálném čase, tzv. kvantitativní PCR (qPCR), důležitá pro zkoumání genové exprese.

Metoda rep-PCR využívá (GTG)₅ specifického primeru s amplifikací opakujících se sekvencí (73, 74).

1.2.2.3. RFLP (Polymorfismus délky restrikčních fragmentů)

Štěpení DNA pomocí speciálních enzymů, tzv. restrikčních endonukleáz (např. EcoR1). Tyto enzymy rozpoznávají specifické sekvence nukleotidů a na jejich základě provádějí odpovídající rozštěpení dvouvláknové DNA. Počet a velikost získaných fragmentů závisí na počtu a rozmístění rozpoznávané cílové sekvence. Na odlišnostech v počtu a hlavně v rozmístění cílových sekvencí (velikosti získaných fragmentů) je pak založeno porovnávání kmenů pro epidemiologické a identifikační účely. Separace získaných fragmentů se nejčastěji

provádí pomocí elektroforézy agarózového gelu. Často se tato metoda využívala např. při mapování genomu (75).

PCR-RFLP – pomocí primerů amplifikujeme nejdřív pouze určitou část genomu, výsledné amplikony pomocí restriční endonuklázy rozštěpíme na fragmenty a následuje opět separace těchto fragmentů na agarózovém gelu. Zásadní je výběr správné restriční endonukleázy a správného genu.

1.2.2.4. 16S rRNA analýza

Porovnáváme nukleotidové sekvence pouze jednoho genu - gen pro 16S rRNA, která tvoří kostru prokaryotické malé 30S ribozomální podjednotky, a obsahuje úseky jak konzervované tak variabilní. Z konzervovaných úseků jsou navrženy primery a porovnávají se variabilní části. Geny, které tuto RNA kódují, se používají při fylogenetických rekonstrukcích díky pomalým rychlostem vývoje tohoto genu. Sangerovou sekvenční metodou získáme sekvenci, která se porovná se sekvencemi uloženými na serveru BLAST a kde je jednotlivým sekvencím vždy přiřazen určitý bakteriální druh/rod (76).

1.2.2.5. Celogenomová sekvenace

Celogenomová sekvenace pro účely identifikace mikroorganismů se v současnosti provádí metodami sekvenování nové generace (NGS – next-generation sequencing). DNA cílového organismu je fragmentována (vznikne tzv. knihovna) a vzniklé fragmenty jsou pak sekvenované některou z metod NGS. Výsledkem je soubor milionů krátkých úseků tzv. readů. Ready se překrývají a tak je celý genom sekvenován mnohonásobně (tzv. hloubka sekvenování - vyšší číslo znamená lepší spolehlivost).

Pro další zpracování má zásadní význam délka readů a kvalita (pravděpodobnost, že jednotlivé nukleotidy byly určeny správně). Technologie poskytující krátké (typicky 100-250 bp) vysoce kvalitní ready, jako je Illumina, se hodí pro přesnou rekonstrukci jednotlivých genů, pro určení architektury genomu a hledání plasmidů jsou vhodné delší (10000 bp), i když méně kvalitní ready, které poskytuje Oxford Nanopore a PacBio.

Překrývající se ready jsou pak in silico (speciálními softwary) poskládány do větších úseků tzv. kontigů, které v případě dlouhých readů představují celý genom, v případě krátkých jeho podstatnou část. Často je však nutné sporné úseky ještě přesekvenovat Sangerovou metodou (problémem jsou dlouhé repetitivní sekvence, pokud jsou rozmístěny na více místech genomu). Pro stanovení změn jednotlivých nukleotidů (SNP – Single-nucleotide polymorphism) se krátké ready srovnávají s referenční sekvencí (77).

1.3. Charakteristika studovaných agens

1.3.1. *Campylobacter* spp.

Zástupci rodu *Campylobacter* jsou jednou z hlavních příčin průjmových nemocí na celém světě (78, 79). V rámci rodu *Campylobacter* se druhy *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* podílejí na většině lidských infekcí, vzácně mohou vyvolat i závažné poinfekční stavy jako je Guillain-Barré syndrom a reaktivní artritida (80). *Campylobaktery* jsou primárně zoonotické, s různými zvířecími rezervoáry – střevní trakt divokých a domácích zvířat (81, 82, 83, 84, 85). Konzumace čerstvého nepasterizovaného mléka a nesprávně uvařených drůbežích produktů jsou hlavními rizikovými faktory lidských infekcí (86), zejména u imunokompromitovaných pacientů (87).

Campylobaktery jsou gramnegativní zakřivené tyčky, patřící mezi kultivačně náročné, druhy *C. jejuni* a *C. coli* jsou striktně mikroaerofilní, tj. vyžadující nižší koncentraci kyslíku (88). *Campylobaktery* jsou kataláza i oxidáza pozitivní (88), jinak jsou považovány za biochemicky neaktivní (89). Obvykle jsou diagnostikovány izolací organismu na selektivní médium a identifikované fenotypovými testy; identifikace druhů však na základě výsledků biochemických testů není často spolehlivá a dává kontroverzní výsledky (90).

1.3.2. *Plesiomonas shigelloides*

P. shigelloides je potenciální střevní patogen; bývá spojována s průjmovými většinou nepříliš závažnými onemocněními, které se vyskytují nejčastěji v rozvojových a / nebo tropických zemích (91, 92). Gramnegativní oxidáza pozitivní tyčka, má některé vlastnosti shigel, včetně antigenů (z tohoto důvodu je druhové jméno „shigelloides“; 88); bývá izolována z vody, půdy a je rozšířena u mnoha druhů zvířat (93). Typizace plesiomonád se provádí podle mezinárodního antigenního schématu (94).

1.3.3. *Citrobacter* spp.

Zástupci rodu *Citrobacter* se běžně vyskytují v půdě, vodě i střevním traktu zvířat (95) i u lidí v gastrointestinálním traktu. Gramnegativní kataláza negativní tyčky, řazené do řádu Enterobacterales, jsou považovány za oportunní patogeny (96), mohou vyvolat infekce v urogenitálním traktu, v plicích, v krvi, mozkomíšním moku i v ranách (97, 98). Jsou primárně rezistentní k cefalosporinům 1. a 2. generace (88).

1.3.4. *Staphylococcus intermedius*/*S. pseudintermedius* (*S. intermedius*-group, SIG)

Druhy rodu *Staphylococcus* jsou grampozitivní, kataláza pozitivní koky, mezi které patří jeden z neznámějších a nejčastěji se vyskytujících lidských patogenů *S. aureus* („zlatý stafylokok“). *S. intermedius* byl poprvé popsán v roce 1976 českým mikrobiologem Václavem Hájkem (99). Již Hájek však upozorňoval na fenotypovou variabilitu uvnitř tohoto druhu, což bylo i později potvrzeno popisem dalšího velmi podobného druhu *S. pseudintermedius* (100). Oba tyto druhy jsou spolu se *S. delphini* (101) a nedávno popsáným *S. cornubiensis* (102) koaguláza pozitivní (stejně jako *S. aureus*). Zcela recentně byl popsán *S. ursi* (103), který je ovšem koaguláza negativní, nicméně všechny tyto druhy jsou v současnosti zařazeny do skupiny označované jako SIG (*Staphylococcus intermedius*-group). Zástupci této skupiny jsou zoonotické patogeny, jsou hlavní součástí kožní mikrobioty různých organismů schopných způsobovat různé infekce u zvířat (104) a byl prokázán přenos *S. pseudintermedius* ze zvířat (psů a koček) na člověka (veterinární personál, majitelé zvířat; 105, 106, 107).

1.3.5. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (netyfové kmeny)

Rod *Salmonella* zahrnuje gramnegativní, kataláza negativní tyčky, řazené do řádu Enterobacterales, v současnosti má tento rod pouze 2 druhy – *S. enterica* a *S. bongori*. *S. enterica* se pak dělí do několika poddruhů, z nichž nejpočetnější je poddruh *S. enterica* subsp. *enterica*. V současnosti je známo přes 2500 sérovarů salmonel (108, 109).

Salmonelové infekce dělíme dle odlišné patogeneze a klinického obrazu do 2 skupin: Břišní tyfus a skupina paratyfů, což jsou výhradně lidské infekce, a salmonelózy – gastroenteritidy vyvolané zoopatogenními kmeny salmonel (110).

2. Cíle disertační práce

- charakterizovat a/nebo reidentifikovat vybrané skupiny infekčních agens (*Campylobacter* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Citrobacter* spp., *Staphylococcus intermedius* group, *Salmonella* spp) pomocí moderních metod (MALDI-TOF MS, PCR, PCR-RFLP)
- prokázat větší efektivitu nových metod identifikace ve srovnání s klasickými rutinními mikrobiologickými metodami (biochemie, mikroskopie)
- zjistit antibiotickou rezistenci u netyfových kmenů salmonel izolovaných od lidí

3. Materiál

3.1. Kmeny

Studované kmeny pocházejí z těchto pracovišť:

a) Česká národní sbírka typových kultur:

- rod *Campylobacter* – 42 izolátů získaných v letech 1983-89, z toho 31 izolátů ze stolice, 4 izoláty z trusu zvířat, 7 izolátů neznámého původu; 3 typové/referenční kmeny (*C. jejuni* ssp. *jejuni* CNCTC 7365^T, *C. coli* CNCTC 7377^T, *C. hyointestinalis* CNCTC 7378^T)
- *Plesiomonas shigelloides* – 74 izolátů (včetně typového kmene CNCTC 6299^T) z různých klinických vzorků, viz Aldová *et al.* (94).
- rod *Citrobacter* – 152 izolátů ze stolice, moči, hnisu a dalších zdrojů, získaných v letech 1950-88; 11 typových kmenů (*C. amalonaticus* CNCTC 5844^T, *C. braakii* CNCTC 5070^T, *C. farmerii* CNCTC 5082^T, *C. freundii* DSM 30039^T, *C. gillanii* CNCTC 5065^T, *C. koserii* CNCTC 7392^T, *C. murlinae* CNCTC 5066^T, *C. rodentium* CNCTC 5064^T, *C. sedlakii* CNCTC 5068^T, *C. werkmanii* CNCTC 5067^T, *C. youngae* CNCTC 5038^T)

b) Česká národní sbírka typových kultur a/nebo Národní referenční laboratoř pro stafylokoky:

- *S. intermedius/pseudintermedius* – 59 izolátů, 44 humánního původu, 13 izolátů ze zvířat, 2 typové kmeny *S. intermedius* a *S. pseudintermedius*

c) Národní referenční laboratoř pro antibiotika – konsekutivní izoláty salmonel ze 48 mikrobiologických laboratoří přijaté v rámci studie antibiotické rezistence u netyfových sérovarů *Salmonella* spp. v České republice:

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* – 637 kmenů, různé sérovary; 613 kmenů pocházelo ze stolice (98,9 %), 5 kmenů (0,8 %) z krve, 6 kmenů bylo mimostřevního původu (moč, hnis, výtěr z pochvy), 13 kmenů bylo neznámého původu.

3.2. Kultivační média a kity

Columbia krevní agar (CBA, Oxoid, Velká Británie) s přidavkem 5% beranní krve

CampyGen kit (Atmosphere Generation System; Oxoid)

Nutrient agar (NA, Oxoid, Velká Británie)

Mueller- Hinton agar (MHA, Oxoid, Velká Británie)

Mueller- Hinton bujon (MHB, Oxoid, Velká Británie)

3.3. Ostatní materiál (matrice, primery, testy, séra)

- Matrice:
 - 1) kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (*Campylobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Staphylococcus intermedius/S. pseudintermedius*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*)
 - 2) kyselina 3-methoxy-4-hydroxyskořicová (*Plesiomonas shigelloides*)
- Primery:
 - 1) *Campylobacter* spp.
C. coli (velikost amplikonu 364 bp):
F: 5'-AGG CAA GGG AGC CTT TAA TC-3'
R: 5'-TAT CCC TAT CTA CAA ATT CGC-3'

C. jejuni (velikost amplikonu 773 bp):

F: 5'-CAT CTT CCC TAG TCA AGC CT-3'

R: 5'-AAG ATA TGG CTC TAG CAA GAC-3'

2) *Staphylococcus intermedius/S. pseudintermedius* (velikost amplikonu 320 bp):

F: 5'-AAA GAC AAA CTT TCA GGT AA-3'

R: 5'-GCA TAA ACA AGC ATT GTA CCG-3'

- Biochemické zkumavkové testy (*Citrobacter* spp ; n=40, Farmerova matice, 68):
produkce indolu, methyl red (MR) test, Voges–Proskauerův (VP) test, Simmons citrát agar, produkce sirovodíku (TSI), hydrolýza urey (močoviny), test na fenylalanin deaminázu, test na lysin dekarboxylázu, test na arginin dihydrolázu, test na ornitin dekarboxylázu, pohyb (36 °C), utilizace malonátu, produkce kyseliny z D-glukózy, produkce plynu z D-glukózy, fermentace laktózy, fermentace sacharózy, fermentace galaktitolu (“dulcitolu”), fermentace salicinu, fermentace ribitolu (“adonitolu”), fermentace myo-inositolu, fermentace glucitolu (“sorbitolu”), fermentace L-arabinózy, fermentace raffinózy, fermentace L-rhamnózy, fermentace maltózy, fermentace D-xylózy, fermentace trehalózy, fermentace cellobiózy, fermentace α -metyl-D-glukozidu, hydrolýza eskulinu, fermentace mellibiózy, fermentace D-arabitolu, fermentace glycerolu, fermentace mukátu, utilizace tartrátu (tartrate Jordan’s agar), utilizace acetátu, redukce nitrátů, ONPG test, produkce žlutého pigmentu a fermentace D-mannózy.
- komerční hyperimunní králičí séra (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*; SIFIN, BioRad, Denka Seiken, Reagensia)

4. Metody

- PCR (*Campylobacter* spp)

Cílová (Target) DNA byla izolována pomocí soupravy na přípravu templátu - Template preparation kit (Promega). PCR byla provedena v celkovém objemu 25 µl, každá jednotlivá směs PCR obsahovala ~ 20 ng templátové DNA, 10 pmol/1 každého oligonukleotidového primeru, 10 µl H₂O a 11 µl Master Mixu (Qiagen).

PCR byla prováděna za použití termocykleru GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) při následujících podmínkách: počáteční denaturace (5 min 95 °C), dvakrát (1 min 94 °C, 1 min 64 °C, 1 min 72 °C), dvakrát (1 min 94 °C, 1 min 62 °C, 1 min 72 °C), dvakrát (1 min 94 °C, 1 min 60 °C, 1 min 72 °C), dvakrát (1 min 94 °C, 1 min 58 °C, 1 min 72 °C), dvakrát (1 min 94 °C, 1 min 56 °C, 1 min 72 °C), 30 cyklů (1 min 94 °C, 1 min 54 °C, 1 min 72 °C) a závěrečné prodloužení 10 min 72 °C (111). Produkty PCR byly vizualizovány v 2% agarózovém gelu (Certified™ PCR agaróza; Bio-Rad) a barvením ethidiumbromidem (1 µg/ml po dobu 30 minut).

PCR (*Staphylococcus intermedius/S. pseudintermedius*)

Extrakce genomové DNA všech izolátů byla provedena pomocí bakteriální genomické DNA purifikační soupravy (Sigma-Aldrich) podle pokynů výrobce. DNA amplifikace 320-bp fragmentu genu *pta* byla provedena v objemu 25 µl obsahujícím koncentraci 0,2 nmol / L oligonukleotidových primerů s hlavní směsí Taq DNA polymerázy (BioLabs). PCR reakční podmínky: počáteční denaturace 95 °C po dobu 2 minut, 30 cyklů 95 °C po dobu 1 minuty, 53 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 1 minuty, s konečnou inkubací 72 °C po dobu 7 min. PCR amplikony byly inkubovány s 5 U enzymu Mbo I (Thermo Scientific) obohaceného o 2,5 µl 10x digesčního pufru po dobu 2 hodin; produkty byly následně elektroforézou rozděleny na 2% agaróze.

- MALDI-TOF MS

Hmotnostní spektra byla získána za použití hmotnostního spektrometru Bruker Autoflex, (*Campylobacter* spp, *Plesiomonas shigelloides*, *Citrobacter* spp.) a/nebo Bruker Microflex MALDI Biotyper (*Staphylococcus intermedius/S. pseudintermedius*, *Salmonella* spp).

- Biochemická identifikace (*Citrobacter* spp)

Biochemické testy byly navrženy dle Farmerovy matice (68), do testování nebyly zařazeny testy, které měly buď nízkou diskriminativní schopnost (fermentace D-mannitolu, fermentace erythritolu, test na lipázu, DNAázu a oxidázu) nebo měly nejednoznačné výsledky (testy na hydrolýzu želatiny a růst v KCN)

Interpretace biochemických testů:

K interpretaci dat byla použita Farmerova matice (68; procenta pozitivních reakcí byla použita jako referenční hodnoty). Identifikační skóre byla vypočtena pomocí zjednodušené Bayesovy věty.

$$P(t_i|R) = \frac{P(R|t_i)}{\sum_i P(R|t_i)}$$

- Sérotypizace (*Salmonella* spp)

Při sérologické diagnostice byla použita metoda sklíčkové aglutinace s komerčními hyperimunními králíčími séry; typování salmonel, tj. zařazení do sérovarů, bylo provedeno podle White-Kauffmann-LeMinorova schématu (108).

- Vyšetření citlivosti (*Salmonella* spp)

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) 11 antibiotik (ampicilin, cefotaxim, ceftazidim, cefepim, meropenem, gentamicin, ciprofloxacin, trimethoprim, chloramfenikol, tetracyklin, sulfamethoxazol) byla vyšetřena bujónovou mikrodiluční metodou pro gramnegativní střevní tyčky (112). U všech antibiotik byla vyšetřena/testována posloupná řada 8 koncentrací (řaděných dvojnásobně geometrickou řadou). K interpretaci výsledků vyšetření MIC byla použita kritéria EUCAST (113) pro 2 antibiotika (tetracyklin a sulfamethoxazol) kritéria CLSI (114).

Produkce ESBL byla vyšetřena diskovou metodou podle Hrabák *et al.* (115).

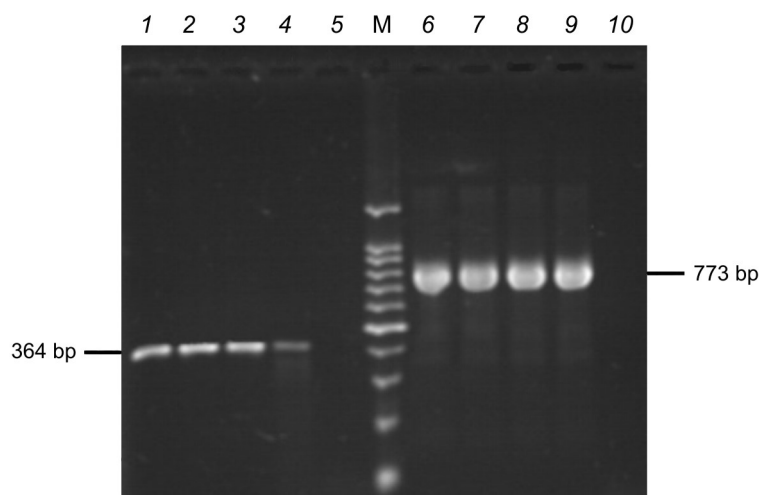
5. Výsledky

1) *Campylobacter* spp.

- Předchozí biochemická identifikace (v letech 1983-89) přiřadila všech 42 kmenů k druhu *C. jejuni*.
- Moderní metoda PCR (s jedním specifickým primerem pro *C. jejuni* a/nebo *C. coli*) oba druhy bezpečně odlišila (obr. 6, tabulka 2).
- Analýza získaných MALDI-TOF MS spekter přesvědčivě rozdělila všechny izoláty do druhů *C. jejuni* a *C. coli* (tabulka 2). Na základě analyzovaných MALDI-TOF MS spekter byl vytvořen dendrogram, viz obr. 7. Pomocí této metody jsme potvrdili původní identifikaci do druhu *C. jejuni* u 26 kmenů, 16 kmenů bylo reklasifikováno do druhu *C. coli*.

Výše uvedené výsledky ukázaly, že obě tyto metody (PCR i MALDI-TOF MS) jsou dostatečně efektivní pro rozlišení druhů *C. jejuni* a *C. coli*.

Obrázek 6. Výsledky PCR detekce specifického produktu *C. jejuni* a *C. coli*; 1 - *C. coli* CNCTC 7377^T (364 bp, pozitivní kontrola), 2 - CNCTC 6786, 3 - CNCTC 6779, 4 - CNCTC 5234, 5 - negativní kontrola; 6 - *C. jejuni* subsp. *jejuni* CNCTC 7365^T (773 bp, pozitivní kontrola), 7 - CNCTC 6784, 8 - CNCTC 6780, 9 - CNCTC 6286, 10 - negativní kontrola; M - marker molekulové velikosti.

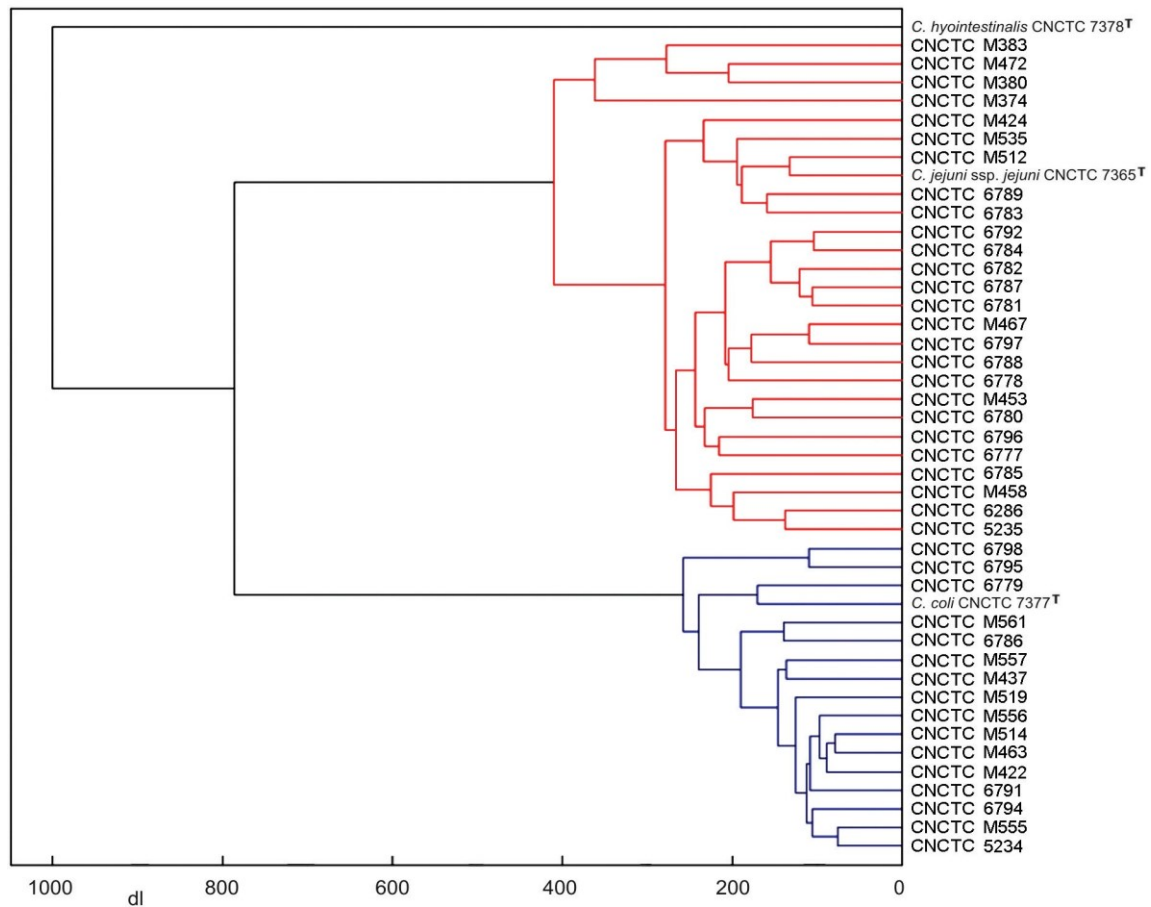


Tabulka 2. Výsledky identifikace u zkoumaných kmenů rodu *Campylobacter*:

CNCTC číslo	Původ	Rok izolace	PCR primer ^a		MALDI-TOF
			<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	
5234	prase	1983	+	-	<i>C. coli</i>
5235	člověk	1986	-	+	<i>C. jejuni</i>
6286	člověk	1983	-	+	<i>C. jejuni</i>
6777	člověk	1983	-	+	<i>C. jejuni</i>
6778	člověk	1983	-	+	<i>C. jejuni</i>
6779	člověk	1983	+	-	<i>C. coli</i>
6780	člověk	1983	-	+	<i>C. jejuni</i>
6781	člověk	1983	-	+	<i>C. jejuni</i>
6782	člověk	1986	-	+	<i>C. jejuni</i>
6783	člověk	1986	-	+	<i>C. jejuni</i>
6784	husa	1986	-	+	<i>C. jejuni</i>
6785	člověk	1989	-	+	<i>C. jejuni</i>
6786	člověk	1986	+	-	<i>C. coli</i>
6787	člověk	1985	-	+	<i>C. jejuni</i>
6788	člověk	1985	-	+	<i>C. jejuni</i>
6789	člověk	1986	-	+	<i>C. jejuni</i>
6791	člověk	1983	+	-	<i>C. coli</i>
6792	člověk	1986	-	+	<i>C. jejuni</i>
6794	králík	1986	+	-	<i>C. coli</i>
6795	člověk	1986	+	-	<i>C. coli</i>
6796	člověk	1986	-	+	<i>C. jejuni</i>
6797	člověk	1988	-	+	<i>C. jejuni</i>
6798	člověk	1988	+	-	<i>C. coli</i>
M 374	člověk	1983	-	+	<i>C. jejuni</i>
M 380	člověk	1983	-	+	<i>C. jejuni</i>
M 383	člověk	1983	-	+	<i>C. jejuni</i>
M 422	neznámý	1983	+	-	<i>C. coli</i>
M 424	člověk	1983	-	+	<i>C. jejuni</i>
M 437	člověk	1983	+	-	<i>C. coli</i>
M 453	člověk	1984	-	+	<i>C. jejuni</i>
M 458	člověk	1984	-	+	<i>C. jejuni</i>
M 463	člověk	1984	+	-	<i>C. coli</i>
M 467	kočka	1984	-	+	<i>C. jejuni</i>
M 472	člověk	1984	-	+	<i>C. jejuni</i>
M 512	člověk	1986	-	+	<i>C. jejuni</i>
M 514	člověk	1986	+	-	<i>C. coli</i>
M 519	neznámý	1986	+	-	<i>C. coli</i>
M 535	neznámý	1986	-	+	<i>C. jejuni</i>
M 555	neznámý	1988	+	-	<i>C. coli</i>
M 556	neznámý	1988	+	-	<i>C. coli</i>
M 557	neznámý	1988	+	-	<i>C. coli</i>
M 561	neznámý	1988	+	-	<i>C. coli</i>

^aProdukt po PCR přítomen (+) nebo nepřítomen (-)

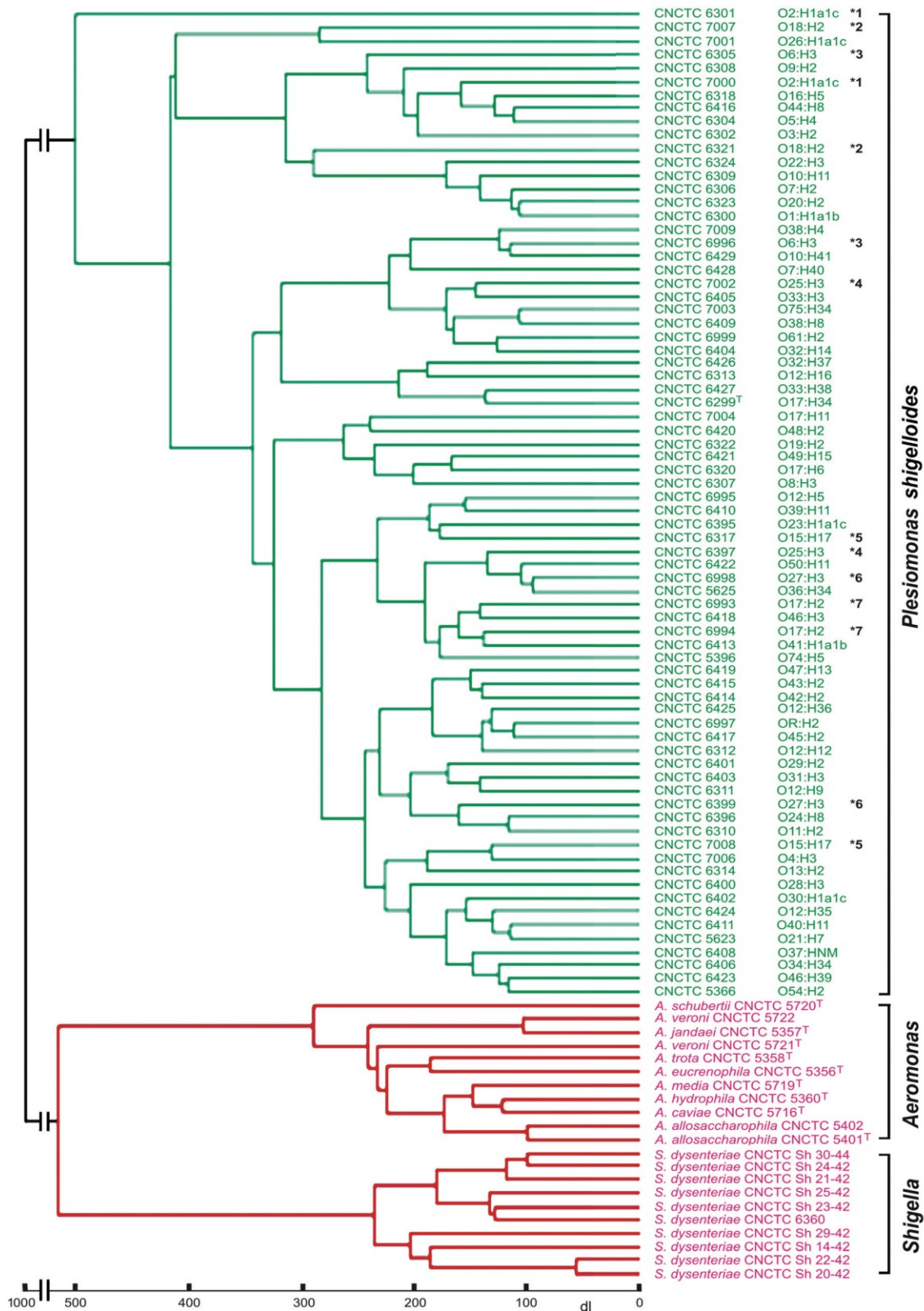
Obrázek 7. Dendrogram vytvořený na základě spekter analyzovaných kmenů (n=45), červeně *C. jejuni*, modře *C. coli*, dl (distance level) - vzdálenost



2) *Plesiomonas shigelloides*

- Původními biochemickými testy (70. až 90. léta 20. století) bylo 74 kmenů určeno jako *Plesiomonas shigelloides*; následnou sérotypizací byly kmene rozřazeny do 67 sérotypů, 7 sérotypů bylo shodných.
- MALDI-TOF MS identifikace potvrdila předchozí druhové zařazení, nicméně nebyla nalezena korelace mezi klastry analýzy MALDI-TOF MS a sérotypy kmenů *P. shigelloides*; kmene *Aeromonas* spp. a *Shigella dysenteriae* byly použity pro porovnání (obrázek 8).

Obrázek 8. Dendrogram vytvořený na základě spekter analyzovaných kmenů: *P. shigelloides* (zeleně, n=74; levý sloupec – čísla kmenů, pravý sloupec – sérotypy, čísla označená hvězdičkou – kmeny se stejným sérotypem), *Aeromonas* spp (červeně, n=11), *S. dysenteriae* (červeně, n=11); dl – vzdálenost



3) *Citrobacter* spp.

- Původní klasická biochemická identifikace.

152 izolátů rodu *Citrobacter* bylo v letech 1950-88 mikrobiologicky/biochemicky identifikováno na úroveň čtyř druhů, 1 kmen byl určen pouze rodově (tabulka 3).

- Současná rozšířená biochemická identifikace (Farmerova matice, 40 zkumavkových testů):

Izoláty, které byly původně popsány v České národní sbírce typových kultur (CNCTC) jako *C. amalonaticus* (n=20), *C. freundii* (n=106), *C. koseri* (dříve *Citrobacter diversus*; n=16), *C. sedlakii* (n=9) a *Citrobacter* sp. (n=1) byly reklasifikovány a některým kmenům byly přiděleny nové názvy druhů (*C. brakii*, *C. farmeri*, *C. gillanii*, *C. werkmanii*, *C. youngae*); tyto kmeny popsal až Brenner *et al.* (116, resp. 117). Původní druhové zařazení bylo potvrzeno u kmenů *C. koseri* a *C. sedlakii*. Nejvyšší počet reklasifikovaných kmenů pocházel ze skupiny izolátů původně zařazených jako *C. freundii*.

Tabulka 3. Reklasifikace původních druhů r. *Citrobacter* za použití biochemických metod (Farmer 2003; 68)

Původní druhová identifikace v CNCTC*	Počet identifikovaných kmenů	Reklasifikace biochemickými metodami (Farmerova matice ^a)	Počet identifikovaných kmenů
<i>C. amalonaticus</i>	20	<i>C. amalonaticus</i>	16
		<i>C. farmerii</i>	3
		<i>C. freundii</i>	1
<i>C. freundii</i>	106	<i>C. braakii</i>	20
		<i>C. freundii</i>	6
		<i>C. gillanii</i>	6
		<i>C. werkmanii</i>	11
		<i>C. youngae</i>	47
		<i>Citrobacter</i> sp. ^b	16
<i>C. koserii</i>	16	<i>C. koserii</i>	16
<i>C. sedlakii</i>	9	<i>C. sedlakii</i>	9
<i>Citrobacter</i> sp.	1	<i>C. youngae</i>	1

*Česká národní sbírka typových kultur

^aFarmer (68)

^bNespolehlivá identifikace

Biochemické zkumavkové testy spolehlivě zařadily do druhu 136 izolátů r. *Citrobacter* (Tab.3+4), nejednoznačně bylo identifikováno 16 kmenů.

- MALDI-TOF MS identifikace.

Byla vyhodnocena spektra 11 typových kmenů a bylo stanoveno několik MS proteinových markerů. Ze 152 analyzovaných kmenů bylo spolehlivě identifikováno 145. Podobně jako u biochemické identifikace bylo nedokonale určeno nejvíc kmenů druhově nejbliže druhu *C. braakii* (Tab. 4).

Tabulka 4. Počet kmenů r. *Citrobacter* identifikovaných na úroveň druhu biochemickými metodami a MALDI-TOF MS

Druhy rodu <i>Citrobacter</i>	Klasifikace do druhu		
	Původní počet kmenů v CNCTC*	Počet kmenů po reidentifikaci biochemickými metodami	Počet kmenů po reidentifikaci metodou MALDI-TOF MS
<i>C. amalonaticus</i>	20	16	16
<i>C. braakii</i>	–	20	28
<i>C. farmerii</i>	–	3	3
<i>C. freundii</i>	106	7	8
<i>C. gillenii</i>	–	6	6
<i>C. koserii</i>	16	16	16
<i>C. sedlakii</i>	9	9	9
<i>C. werkmanii</i>	–	11	13
<i>C. youngae</i>	–	48	46
<i>Citrobacter</i> sp.	1	0	0
Počet spolehlivě identifikovaných kmenů	–	136	145
Nejednoznačná identifikace	–	16**	7***
Celkem kmenů	152	152	152

*Česká národní sbírka typových kultur

** *C. braakii* (6), *C. youngae* (6), *C. freundii* (3), *C. gillenii* (1)

*** *C. braakii* (4), *C. werkmanii* (2), *C. freundii* (1)

Na základě metody MALDI-TOF MS bylo spolehlivě zařazeno do druhu 145 izolátů rodu *Citrobacter* (Tab. 4), nejednoznačně bylo identifikováno pouze 7 kmenů.

4) *Staphylococcus intermedius/S. pseudintermedius* (*S. intermedius* group, SIG)

- Původní biochemická a/nebo MALDI-TOF MS identifikace.

59 kmenů ze skupiny SIG (*Staphylococcus intermedius* group) bylo původně identifikováno jako *S. intermedius*, resp. jako *Staphylococcus intermedius/S. pseudintermedius* (Tab. 5).

- PCR-RFLP.

Tato metoda bezpečně odlišila kmeny *S. intermedius* od kmenů *S. pseudintermedius*, viz tabulka 5. Ze všech 59 zkoumaných kmenů, které byly původně uloženy jako *S. intermedius* (nebo *S. intermedius/S. pseudintermedius*), byla většina *S. pseudintermedius* (89,8 %, n = 53), pouze 6 kmenů (10,2 %) jako *S. intermedius*. Výsledky PCR-RFLP potvrdila i předchozí identifikace v roce 2010 vybraných 26 kmenů (včetně 2 typových kmenů) metodou Rep-PCR podle Švec *et al.* (73), Tabulka 5.

Tabulka 5. Výsledek identifikace druhů *S. intermedius/S. pseudintermedius*. Kmeny stafylokoků pocházejí z České národní sbírky typových kultur (CNCTC) a NRL pro stafylokoky

Číslo kmene	Rok izolace/ identifikace	Původ	Původní identifikace	Výsledek PCR/RFLP	Výsledek Rep-PCR ^c
5681 ^{ad}	1975	Holub	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
6046 ^a	1979	neznámý	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	–
7130 ^a	1979	Kuna	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	–
6047 ^a	1985	Pes	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
6048 ^a	1985	Pes	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
6049 ^a	1985	Pes	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	–
6050 ^a	1985	Pes	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
6051 ^a	1985	Pes	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
6052 ^a	1985	Pes	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
6053 ^a	1986	Pes	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
6054 ^a	1986	Pes	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
6718 ^a _00/523 ^b	2000	neznámý	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
00/227 ^b	2000	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
00/470 ^b	2000	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
00/621 ^b	2000	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
00/892 ^b	2000	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
00/984 ^b	2000	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
01/704 ^b	2001	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
01/719 ^b	2001	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
01/777 ^b	2001	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
01/824 ^b	2001	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
01/900 ^b	2001	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
02/013 ^b	2002	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>

02/139 ^b	2002	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
02/172 ^b	2002	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
02/179 ^b	2002	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
02/218 ^b	2002	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
02/264 ^b	2002	Pes	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
02/423 ^b	2002	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
02/438 ^b	2002	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
02/573 ^b	2002	Pes	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
02/589 ^b	2002	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
02/682 ^b	2002	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
02/718 ^b	2002	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
03/033 ^b	2003	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
7634 ^a 03/087 ^b	2003	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
03/215 ^b	2003	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
03/378 ^b	2003	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
03/420 ^b	2003	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
04/304 ^b	2004	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
04/670 ^b	2004	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
05/085 ^b	2005	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
05/560 ^b	2005	Člověk	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
05/886 ^b	2005	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
06/478 ^b	2006	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
06/528 ^b	2006	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
06/915 ^b	2006	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
07/514 ^b	2007	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	–
07/849 ^b	2007	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
07/860 ^b	2007	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
08/1041 ^b	2008	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
08/866 ^b	2008	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
09/627 ^b	2009	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
09/932 ^b	2009	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
10/274 ^b	2010	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
10/857 ^b	2010	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
11/0038 ^b	2012	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
12/386 ^b	2012	Člověk	<i>S. intermedius/S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	–
7446 ^{ad}	2015	Kočka	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>

^a Kmeny z CNCTC (Česká národní sbírka typových kultur)

^b Kmeny z NRL pro stafylokoky

^c Výsledek Rep-PCR (Švec *et al.*; 73)

^d Typový kmen

5) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (netyfové kmeny)

- Metodou MALDI-TOF MS byly prověřeny všechny izoláty na transportních půdách a 637 kmenů bylo identifikováno jako *Salmonella enterica*/spp.
- Sérologická diagnostika zařadila kmeny do 8 sérovarů; nejčastěji byl izolován sérovar Enteritidis (89,6 % všech kmenů), následovaly sérovary Typhimurium (4,7 %) a monofázická varianta *S. Typhimurium* 4,[5],12:i:- (2,0 %); Tabulka 6

Tabulka 6. Sérovary *Salmonella enterica* v souboru 637 kmenů salmonel, počet kmenů a počet rezistentních kmenů* jednotlivých sérovarů.

<i>Salmonella enterica</i> sérovar	Počet kmenů/ počet rezistentních kmenů*	<i>Salmonella enterica</i> sérovar	Počet kmenů/ počet rezistentních kmenů*
Enteritidis	554/39	Mbandaka	4/0
Typhimurium	30/20	Derby, Mikawasima, Saintpaul	3/0
4,[5],12:i:-	13/12	Agona, Anecho, Bareilly, Lichtfield	2/0
Infantis	3/2		
Kentucky	1/1	4,12:d:-, 6,7:z10:-, Abony, Gatuni, Nchanga, Pomona, Senftenberg, Tennessee, SII58:lz13,lz28:z6	1/0
Newport	1/1		
Stanley	1/1		
Virchow	3/3		

* rezistentních k jednomu nebo k více vyšetřovaným antibiotikům

- Ze souboru 637 salmonel bylo celkem 558 kmenů (87,6 %) citlivých ke všem 11 vyšetřovaným antibiotikům, 79 kmenů (12,4 %) bylo rezistentních k jednomu nebo více antibiotikům.

- Podíl rezistentních kmenů k jednotlivým antibiotikům se v souboru všech 637 kmenů pohyboval od 8,5 % (ampicilin, 54 kmenů) do 0,0 % (meropenem, 0 kmenů), viz tabulka 7.

Tabulka 7. Rozmezí minimálních inhibičních koncentrací (MIC) antibiotik, MIC₅₀ a MIC₉₀, klinické breakpointy antibiotik pro Enterobacterales [113] a frekvence rezistence k jednotlivým antibiotikům (%) v souboru 637 salmonel.

Antibiotikum	MIC - Minimální inhibiční koncentrace (mg/l)			Klinický breakpoint mg/l	Podíl rezistentních kmenů* (%)
	Rozmezí MIC	MIC ₅₀	MIC ₉₀		
ampicilin	<= 0,25 - >32	1	2	≤ 8	8,5
cefotaxim	<= 0,063 - > 8	0,125	0,125	≤ 1	0,5
ceftazidim	<= 0,063 - >8	0,25	0,25	≤ 1	0,5
cefepim	<= 0,063 - >8	<=0,063	<=0,063	≤ 1	0,5
meropenem	<= 0,063 - <= 0,063	<=0,063	<=0,063	≤ 2	0,0
gentamicin	<= 0,125 - 8	0,25	0,5	≤ 2	0,3
ciprofloxacin	<= 0,032 - 4	<=0,032	<=0,032	≤ 0,063***	3,8
trimethoprim	<= 0,125 - >8	0,125	0,25	≤ 2	0,3
chloramfenikol	<=8 - > 256	4	4	≤ 8	2,5
tetracyklin**	0,5 - > 32	1	1	≤ 4**	5,7
sulfonamidy**	<=8 - > 256	32	32	≤ 256**	5,2

MIC₅₀: koncentrace antibiotika inhibující 50 % kmenů

MIC₉₀: koncentrace antibiotika inhibující 90 % kmenů.

* rezistentní kmen: MIC antibiotika je vyšší než klinický breakpoint;

** breakpoint CLSI [114];

***specifický breakpoint pro *Salmonella* spp. [113].

- Ze souboru 79 rezistentních kmenů bylo pouze k jednomu antibiotiku rezistentních 51,9 %, tj. 41 kmenů: k ampicilinu 26,6 % (21 kmenů), k ciprofloxacinu 24,1 % (19 kmenů), jeden kmen byl rezistentní pouze k chloramfenikolu. S výjimkou jednoho kmene u sérovaru Kentucky a dvou kmenů u sérovaru Infantis, byly všechny multirezistentní kmeny zaznamenány pouze u sérovaru Typhimurium a jeho

monofázické varianty. U tří kmenů (sérovary Typhimurium) byla zjištěna produkce širokospektré betalaktamázy ESBL (tabulka 8).

Tabulka 8. Vzory rezistence u sérovarů *Salmonella enterica*, počet kmenů, a počet skupin antibiotik, ke kterým jsou kmeny rezistentní.

Vzor rezistence	<i>Salmonella enterica</i> sérovary	Počet kmenů	Počet skupin antibiotik*
AMP	Enteritidis	21	1
CHL	Enteritidis	1	
CIP	Enteritidis	15	
CIP	Stanley	1	
CIP	Virchow	3	
SMX, TCY	Typhimurium	1	2
AMP, TCY	Newport	1	
CIP, TMP	Enteritidis	2	
CIP, SMX, TCY	Infantis	2	3
AMP, SMX, TCY	Typhimurium	1	
AMP, SMX, TCY	4,[5],12:i:-***	12	
AMP, SMX, CHL, TCY	Typhimurium	14	4
AMP, CIP, SMX, CHL, TCY	Typhimurium	1	5
AMP, GEN, CIP, SMX, TCY	Kentucky	1	
AMP, CTX**, CAZ**, FEP**, TCY, ESBL	Typhimurium	2	3 + ESBL
AMP, CTX**, CAZ**, FEP**, SMX, TMP, TCY, ESBL	Typhimurium	1	5 + ESBL

*Počet skupin antibiotik, ke kterým jsou kmeny rezistentní; rezistence ke třem skupinám antibiotik se označuje jako multirezistence; ** skupina cefalosporinů; *** monofázická varianta sérovaru Typhimurium.

Zkratky antibiotik: AMP – ampicilin; CAZ – ceftazidim; CIP – ciprofloxacin; CHL – chloramfenikol; CTX – cefotaxim; FEP – cefepim; GEN – gentamicin; SMX – sulfamethoxazol; TCY – tetracyklin; TMP – trimethoprim; ESBL – širokospektrá beta-laktamáza

6. Diskuse

1) *Campylobacter* spp

PCR je obecně spolehlivou metodou pro identifikaci kampylobakterů jak na rodové (118), tak druhové úrovni (119, 120, 121) v závislosti na uspořádání metody a specifitě primerů. Analýzy metodou MALDI-TOF MS byly založeny na srovnání celých spektrálních profilů, protože identifikace species podle jednoho charakteristického iontu – biomarkeru mohou vést k nesprávným výsledkům. Např. biomarkerem specifickým pro *C. jejuni* navrženým Mandrell *et al.* (122) o hmotnosti 10 276 kDa, přičemž teoretická/vypočtená hodnota hmotnosti je 10 274 kDa. Byl sice nalezen intenzivní signál odpovídající m/z 10 274 kDa (SD ± 1.6) u *C. jejuni*, ale také velmi kvalitní signál s m/z 10 276 kDa (SD ± 1.8) u typového kmene *C. hyointestinalis* (viz obrázek 4). Vzhledem k hodnotám SD u měřených m/z je však zřejmé, že tento signál nemůže být považován bez další doplňující analýzy (fingerprint peptidů po hydrolýze trypsinem) za species-specifický.

Ve srovnání s už dříve publikovanými metodami založenými na jednom specifickém biomarkerovém iontu (123, 122) poskytuje metoda analýzy celého spektra mnohem kvalitnější a širší informace. Je-li navíc fundovaně statisticky zpracována, eliminuje vliv možných změn v intenzitě a lokaci vrcholů ve spektrech, které bývají způsobeny přirozenou heterogenitou vzorků.

Vrcholy m/z s nižší hodnotou (3 000–12 000 Da) použity jako součást spektra charakteristického pro dané druhy (fingerprint – „otisk prstu“ ≈ molekulární identifikátor; 123, 124) a následně se uplatnily při konstruování dendrogramu (obrázek 7).

Efektivitu, přesnost a spolehlivost identifikace metodou MALDI-TOF MS u rodu *Campylobacter* potvrdili také např. Bessède *et al.* (125), Nielsen *et al.* (126), Ying-Hsin Hsieh *et al.* (127), Lawton *et al.* (128) a Ziino *et al.* (129).

2) *Plesiomonas shigelloides*

Nebyla nalezena žádná korelace mezi MS klastry MALDI-TOF MS a sérotypy u kmenů *Plesiomonas shigelloides*, podobně jako Moliner (130) nedokázal rozlišit sérotypy kmenů *Legionella*. U druhu *Listeria monocytogenes* bylo 87 kmenů rozděleno během analýzy MALDI-TOF MS do tří linií, které odpovídaly liniím získaným na PFGE po lýze DNA restrikční endonukleázou ApaI; sérotypy uvnitř jednotlivých linií však nebylo možné od sebe metodou MALDI-TOF MS odlišit (131), stejné výsledky potvrzuje i Koudelka *et al.* (132). Stejně tak i serovary *Salmonella enterica* není možné rozlišit metodou MALDI-TOF MS (133). Nicméně pro jednoduchou identifikaci *P. shigelloides* do druhu (stejně tak jako u ostatních enteropatogenních bakterií) je metoda MALDI-TOF MS rychlý, účinný a nízkonákladový nástroj (134).

3) *Citrobacter* spp

Biochemická identifikace: všechny typové kmeny poskytovaly jednoznačně a spolehlivě všechny identifikační parametry podle Farmera (68) a byly klasifikovány podle odpovídajících druhů převážně s identifikačním skóre 100%. U ostatních kmenů byly v některých případech zjištěny odchylky v běžných fenotypových vlastnostech (jako je indol, H₂S, laktóza, galaktitol, rafinóza, esculin, acetát nebo ONPG), podobné nálezy opakovaně popsány i jinými autory – Gavin *et al.* (135), Becker *et al.* (136). Test na ornithin dekarboxylázu přispěl k rozlišení mezi *C. freundii* a *C. braakii*, což potvrzuje i Farmer (68).

MALDI-TOF MS selhala u sedmi kmenů kvůli přítomnosti markerů typických pro různé druhy. Všechny nejednoznačné identifikace znovu poukázaly na druh komplexu *C. freundii*, kde ve většině případů došlo k pochybnostem mezi *C. freundii* a *C. braakii* viz Khot *et al.* (137), kteří použili metodu extrakce před získáním hmotnostních spekter. Čtyři kmeny mohly být druhově klasifikovány pouze prozatím, protože biochemické ID skóre dosáhlo 70–86% a hmotnostní spektra neobsahovala dostatečné množství jednoznačných markerů jednoho druhu. Data shromážděná v naší studii ukazují, že obě metody jsou vhodné pro identifikaci druhů u rodu *Citrobacter* a vykazují značnou spolehlivost a rychlost; podobné srovnání provedli Guo *et al.* (138). Zjevná variabilita kmenů a blízké genetické vztahy se mohou podílet na částečném nesouladu ve výsledcích identifikace (116, 139, 140).

4) *Staphylococcus intermedius/S. pseudintermedius* (*S. intermedius* group, SIG)

Klasická biochemická diferenciaci mezi členy SIG je přinejmenším složitá a může vést k nespolehlivé nebo nedostatečné identifikaci druhů, MALDI-TOF MS po dodatečném doplnění spektry přineslo lepší výsledky, jak bylo i zdokumentováno jinými autory (141). Nicméně ani touto metodou není možné od sebe bezpečně odlišit druhy *S. intermedius* a *S. pseudintermedius*.

PCR-RFLP se považuje za jednoduchou a rychlou metodu účinnou v taxonomii bakterií (142, 143), vhodnou i v procesu diskriminace SIG. Vzhledem k vysoké úrovni biochemické, fenotypové a sekvenční podobnosti (16S rDNA identita je 99,3%) členů skupiny SIG, identifikace členů této skupiny k druhu závisí na sekvenci vhodných housekeeping genů. PCR-RFLP jako metoda pro identifikaci *S. intermedius/S. pseudintermedius*, byl poprvé popsán Bannoehr *et al.* (144); je založena na detekci restriční místa (↓ GATC ↑) restriční endonukleázou Mbo I v *pta* genu kódujícího enzym fosfoacetyltransferázu.

Na rozdíl od výsledků autorů Van Hoovels *et al.* (145) popisující první izolaci *S. pseudintermedius* od lidí, můžeme potvrdit, že rostoucí množství *S. pseudintermedius* v populaci (lidé, zvířata) bylo věcí nesprávné klasifikace SIG v minulosti, neboť první izolát *S. pseudintermedius* od psa detekovaného v naší studii byl datován do roku 1985 a *S. pseudintermedius* dokumentovaný jako lidský patogen existuje již na počátku 3. tisíciletí (viz tabulka 5). Naše výsledky také ukazují, že oba druhy se vyskytují nezávisle na sobě, protože vytvořily jednotlivé fylogenetické větve (146).

Přestože je *S. pseudintermedius* komensálem i patogenem psa, údaje z literatury potvrdily významnou prevalenci tohoto druhu také jako lidského patogenu (147, 148). V souladu s výsledky jiných studií bylo dále zjištěno, že *S. pseudintermedius* byl nejčastějším druhem stafylokoků ze skupiny SIG nalezeným u lidí i zvířat (100, 147, 149).

5) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (netyfové kmeny)

Soubor našich 637 kmenů salmonel představoval 67% případů salmonelóz uvedených v databázi EPIDAT (150). Počet izolátů z krve byl nízký (0,8 %), v podobných souborech kmenů je uvedena prevalence izolátů salmonel z krve okolo 5 % (151), respektive 5,9 % (152).

Nejpočetnější v Evropě (153) i v USA (152) jsou sérovary Enteritidis a Typhimurium, což potvrzovaly i naše soubory kmenů z let 2000 (154) a 2012.

V našem souboru byla většina kmenů (87,9 %) plně citlivých ke všem vyšetřovaným antibiotikům. Podíl plně citlivých kmenů ve světě kolísá, například v souboru humánních izolátů salmonel v USA bylo plně citlivých 70,3 % kmenů, a značné rozdíly jsou i v souborech kmenů salmonel mezi jednotlivými evropskými zeměmi (153).

Byl i zaznamenán výskyt kmenů *Salmonella* spp. rezistentních k lékům volby salmonelových infekcí ciprofloxacinu nebo k cefalosporinům vyšších generací. V roce 2000 bylo rezistentních k ciprofloxacinu 0,8 % kmenů (154), v naší studii jejich počet významně vzrostl (3,8 % kmenů).

Multirezistentní kmeny byly zaznamenány především u sérovaru Typhimurium a jeho monofázické varianty. Tyto sérovary se Evropou šíří pandemicky, a v posledních letech se jejich prevalence markantně zvyšuje u salmonel z humánních infekcí i v mase prasat, které je pravděpodobným zdrojem infekce (155).

7. Závěr

1. Metodou MALDI-TOF MS byly charakterizovány resp. reidentifikovány 4 skupiny infekčních agens (*Campylobacter* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Citrobacter* spp., *Staphylococcus intermedius*/*Staphylococcus pseudintermedius*). Byla prokázána významně vyšší efektivita metody MALDI-TOF MS v porovnání s původní klasickou biochemickou identifikací.
2. Metoda PCR u zástupců rodu *Campylobacter* se ukázala stejně účinná jako metoda MALDI-TOF MS, rozšířená biochemická identifikace pomocí Farmerovy matice u zástupců rodu *Citrobacter* však prokázala o něco horší výsledky než metoda MALDI-TOF MS; obě metody (PCR i rozšířená biochemická identifikace) byly výrazně pracnější, časově náročnější i finančně nákladnější.
3. Metoda PCR-RFLP bezpečně rozlišila 2 skupiny kmenů velmi podobných druhů *Staphylococcus intermedius* a *Staphylococcus pseudintermedius*, které nebyly rozlišitelné biochemicky a/nebo ani MALDI-TOF MS.
4. Sérologická diagnostika zařadila (po předchozí druhové identifikaci metodou MALDI-TOF MS) izoláty *Salmonella* spp. do 8 sérovarů; nejčastěji byl izolován sérovar Enteritidis (89,6% všech kmenů). V souboru kmenů byla zjištěna relativně nízká frekvence rezistence k vyšetřovaným antibiotikům.

Obecně lze konstatovat, že MALDI-TOF MS je unikátní a současně velmi efektivní metoda pro mikrobiologické aplikace. Výstupem jsou informačně bohatá spektra, jejichž využitelnost v mikrobiologii není omezena pouze na identifikaci, ale tato metoda může charakterizovat některé další komponenty proteomu - lze je aplikovat např. pro detekci markerů virulence, rezistence k antibiotikům, identifikaci možných komponent vakcín, při charakterizaci bakteriocinů a podobně. Hlavními výhodami MALDI-TOF MS aplikované při analýze bakterií je především jednoduchost a rychlost testu, tj. rychlé vyhledání a označení biomarkerů, které jsou pro daný mikroorganismus jedinečné. Technika je vhodná nejen pro identifikaci klinických kmenů, jejichž rodové či druhové určení je standardními metodami obtížné, ale byla s úspěchem aplikována i pro taxonomické účely ve specializovaných laboratořích mezinárodních sbírek mikroorganismů. V laboratořích klinické mikrobiologie

způsobilo zavedení metody MALDI-TOF MS doslova revoluci v diagnostice infekčních chorob a v současnosti tato metoda postupně vytlačuje tradiční techniky identifikace mikroorganismů.

V případech, kdy metodu MALDI-TOF MS je možné použít jen v omezené míře, nastupuje celá paleta ostatních identifikačních metod, které jsou schopny zkoumané kmeny podrobněji charakterizovat, např. sérotypizace, v současné době se však v čím dál větší míře využívají především metody molekulárně biologické.

8. Seznam citací použité literatury

1. Sakhno NG, Gunar OV. Microbial Identification Methods in Pharmaceutical Analysis: Comparison and Evaluation. *Mathews J Pharm Sci* 2016; 1(1): 001.
2. Anhalt J, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 1975; 47: 219–225.
3. Karas M, Hillenkamp F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Anal Chem* 1988; 60 (20): 2299–2301.
4. Tanaka K, Hiroaki W, Yutaka I *et al.* Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1988; 2(8): 151–153.
5. Tanaka K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation [Lecture]. In: Frängsmyr T, ed. *The Nobel Prizes 2002*. Stockholm, Sweden: Nobel Foundation; 2003.
6. Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1989; 3(12): 436–9.
7. Strupat K, Karas M, Hillenkamp F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 1991; 111: 89–102.
8. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F *et al.* Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996; 10(10): 1227–1232.
9. Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectr* 1996; 10: 1992–1996.
10. Lay JO Jr. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectr Rev* 2001; 20: 172–194.
11. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1614–1619.

12. van Belkum A, Welker M, Pincus D, Charrier J-P, Girard V. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology: What Are the Current Issues? *Ann Lab Med* 2017; 37: 475–483.
13. Dřevínek M, Kolínská R. Využití MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii. *Bull ČSSM* 2007; 48: 110–116.
14. Pineda FJ, Antoine MD, Demirev PA, Feldman AB, Jackman J, Longenecker M, Lin JS. Microorganism identification by matrix assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Anal Chem* 2003; 75: 3817–22.
15. Arnold RJ, Reilly JP. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999; 269: 105–112.
16. Kim S, Ruparel HD, Gilliam TC, Ju J. Digital genotyping using molecular affinity and mass spectrometry. *Nat Rev Genet* 2003; 4 (12): 1001–1008.
17. Theel ES, Bryan H, Schmitt BH, Hall L, Cunningham SC, Walchak RC, Patel R, Wengenack NL. Formic Acid-Based Direct, On-Plate Testing of Yeast and *Corynebacterium* Species by Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization –Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3093–3095.
18. Bruker Daltonics. Standard Operating Procedure: Inactivated Mycobacteria Bead Preparation Method (in Mbpm) Billerica, Mass, USA. Bruker Daltonics 2012.
19. Mediavilla-Gradolph MC, De Toro-Peinado I, Bermúdez-Ruiz MP, García-Martínez Mde L, Ortega-Torres M, Montiel Quezel-Guerraz N, Palop-Borrás B. Use of MALDI-TOF MS for identification of nontuberculous mycobacterium species isolated from clinical specimens. *Biomed Res Int* 2015; p. 854078.
20. Aravena-Román M, Spröer C, Siering C, Inglis T, Schumann P, Yassin AF. *Corynebacterium aquatimens* sp. nov., a lipophilic *Corynebacterium* isolated from blood cultures of a patient with bacteremia. *Syst Appl Microbiol* 2012; 35: 380–384.
21. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horr  R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG. Matrix-Assisted Laser

- Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2912–2917.
22. Walková R, Janouškovcová H, Šnajdrová M, Hubka V, Čmoková A, Hrabák J. Identifikace dermatofytů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. *Čes-slov Derm* 2018; 93: 205–292.
 23. Barnini S, Ghelardi E, Brucculeri V, Morici P, Lupetti A. Rapid and reliable identification of Gram-negative bacteria and Gram-positive cocci by deposition of bacteria harvested from blood cultures onto the MALDI-TOF plate. *BMC Microbiol* 2015; 15, 124.
 24. Almuzara M, Barberis C, Traglia G, Famiglietti A, Ramirez MS, Vay C. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spektrometry for species identification of nonfermenting gram-negative bacilli. *J Microbiol Methods* 2015; 112, 24–27.
 25. Gautam V, Sharma M, Singhal L, Kumar S, Kaur P, Tiwari R, Pallab Ray P. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging tool for unequivocal identification of non-fermenting Gram-negative bacilli, *Indian J Med Res* 2017; 145 (5): 665–672.
 26. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*. 2017; 138: 20–29.
 27. Ikryannikova LN, Filimonova AV, Malakhova MV, Savinova T, Filimonova O, Ilina EN, Dubovickaya VA, Sidorenko SV, Govorun VM. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. *Clin. Microbiol. Infect* 2013; 19: 1066–1071.
 28. Kärpänoja P, Harju I, Rantakokko-Jalava K, Haanperä M, Sarkkinen H. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of viridans group streptococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33(5): 779–788.
 29. Chen JH, She KK, Wong OY, Teng JL, Yam WC, Lau SK, Woo PC, Cheng VC, Yuen KY. Use of MALDI Biotyper plus ClinProTools mass spectra analysis for correct identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis/oralis*. *J Clin Pathol* 2015; 68(8): 652–656.

30. Jadhav S, Gulati V, Fox EM, Karpe A, Beale DJ, Sevir D, Bhave M, Palombo EA. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Food Microbiol*. 2015; 202: 1–9.
31. Handal N, Bakken Jørgensen S, Smith Tunsjø H, Johnsen BO, Leegaard TM. Anaerobic blood culture isolates in a Norwegian university hospital: identification by MALDI-TOF MS vs 16S rRNA sequencing and antimicrobial susceptibility profiles. *APMIS* 2015; 123(9): 749–758.
32. Hsu YM, Burnham CA. MALDI-TOF MS identification of anaerobic bacteria: assessment of pre-analytical variables and specimen preparation techniques. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014; 79(2): 144–148.
33. Shannon S, Kronemann D, Patel R, Schuetz AN. Routine use of MALDI-TOF MS for anaerobic bacterial identification in clinical microbiology. *Anaerobe*. 2018; 54: 191–196.
34. Angeletti S, Lo Presti A, Cella E, Dicuonzo G, Crea F, Palazzotti B, Dedej E, Ciccozzi M, De Florio L. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and Bayesian phylogenetic analysis to characterize *Candida* clinical isolates. *J Microbiol Methods* 2015; 119: 214–222.
35. Alizadeh M, Kolecka A, Boekhout T, Zarrinfar H, Ghanbari Nahzag MA, Badiee P, Rezaei-Matehkolaei A, Fata A, Dolatabadi S, Najafzadeh MJ. Identification of *Candida* species isolated from vulvovaginitis using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Curr Med Mycol* 2017; 3(4): 21–25.
36. Del Chierico F, Masotti A, Onori M, Fiscarelli E, Mancinelli L, Ricciotti G, Alghisi F, Dimiziani L, Manetti C, Urbani A, Muraca M, Putignani L. MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. *J Proteomics* 2012; 75(11): 3314–3330.
37. Choi Y, Wang HY, Lee G, Park SD, Jeon BY, Uh Y, Kim JB, Lee HV. PCR-reverse blot hybridization assay for screening and identification of pathogens in sepsis. *J Clin Microbiol* 2013; 51(5): 1451–1457.

38. Hubka V, Větrovský T, Dobiášová S, Skořepová M. *et al.* Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice – výsledky dvouleté studie. *Čes–slov Dermatol* 2014; 89(4): 167–174.
39. Krokhin O, Li Y, Andonov A, Feldmann H, Flick R, Jones S, Stroehrer S, Bastien N, Dasuri KVN, Cheng K, Simonsen JN, Perreault H, Wilkins J, Ens W, Plummer F, Standing KG: Mass Spectrometric Characterization of Proteins from the SARS Virus *Mol Cell Proteomics* 2003; 2(5): 346–356.
40. Peng J, Yang F, Xiong Z, Guo J, Du J, Hu Y, *et al.*: Sensitive and rapid detection of viruses associated with hand foot and mouth disease using multiplexed MALDI-TOF analysis. *J Clin Virol* 2013; 56: 170–174.
41. Milewska A, Ner-Kluza J, Dabrowska A, Bodzon-Kulakowska A, Pyrc K, Suder P: Mass Spectrometry in Virological Sciences. *Mass Spectrometry Reviews*, 2019; 00: 1–24.
42. Gould O, Ratcliffe N, Król E, de Lacy Costello B: Breath analysis for detection of viral infection, the current position of the field. *J Breath Res* 2020; 14(4): 041001.
43. Mahmud I, Garrett TJ: Mass Spectrometry Techniques in Emerging Pathogens Studies: COVID-19 Perspectives. *J Am Soc Mass Spectrom* 2020; 31: 2013–2024.
44. Calderaro A, Arcangeletti M-C, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F, Germini D, Medici M-C, Chezzi C, De Conto F: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Sci Rep* 2014; 4: 6803.
45. Cheng C, Lin T, Zhu M, Kaili Wu K. Identification of Herpes simplex virus type 1 by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Investigative Ophthalmol Visual Sci* 2019; 60: 5093.
46. Iles RK, Zmuidinaite R, Iles JK, Carnell G, Sampson A, and Heeney JL. Development of a Clinical MALDI-ToF Mass Spectrometry Assay for SARS-CoV-2: Rational Design and Multi-Disciplinary Team Work. *Diagnostics* 2020; 10: 746.

47. Rocca MF, Zintgraff JC, Dattero ME, Santos LS, Ledesma M, Vay C, Prieto M, Benedetti E, Avaro M, Russo M, Nachtigall FM, Baumeister E. A Combined approach of MALDI-TOF Mass Spectrometry and multivariate analysis as a potential tool for the detection of SARS-CoV-2 virus in nasopharyngeal swabs. *J Virol Methods* 2020; 286: 113991.
48. Cobo F. Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Virology: A Review. *Open Virol J* 2013; 7: 84–90.
49. Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics* 2013; 10(2): 151–164.
50. Seifert H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2009; 48 Suppl 4: S 238–245.
51. Romero-Gómez MP, Gómez-Gil R, Paño-Pardo JR, Mingorance J. Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 Compact is rapid and effective. *J Infect* 2012; 65(6): 513–520.
52. Elodie Duriez E, Armengaud J, Fenaille F, Ezan E. Mass spectrometry for the detection of bioterrorism agents: from environmental to clinical applications. *J Mass Spectrom* 2016; 51: 183–199.
53. Vrioni G, Tsiamis C, Oikonomidis G, Theodoridou K, Kapsimali V, Tsakris A. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann Transl Med* 2018; 6(12): 240.
54. Feucherolles M, Cauchie H-M, Penny C. MALDI-TOF Mass Spectrometry and Specific Biomarkers: Potential New Key for Swift Identification of Antimicrobial Resistance in Foodborne Pathogens. *Microorganisms* 2019; 7: 593.
55. Hrabák J, Walková R, Študentová V, Chudáčková E and Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3222–3227.

56. Flores-Treviño S, Garza-González E, Mendoza-Olazarán S, Morfín-Otero R, Camacho-Ortiz A, Rodríguez-Noriega E, Martínez-Meléndez A, Bocanegra-Ibarias P. Screening of biomarkers of drug resistance or virulence in ESCAPE pathogens by MALDI-TOF mass spectrometry. *Scientific Reports* 2020; 9: 18945.
57. Axelsson A, Rehnstam-Holm A-S, Nilson B. Rapid detection of antibiotic resistance in positive blood cultures by MALDI-TOF MS and an automated and optimized MBT-ASTRA protocol for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Dis* 2020; 52(1): 45–53.
58. Hrabák J, Dolejská D, Papagiannitsis CC. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry for Determination of Resistance to Antibiotics. In *MALDI-TOF Mass Spectrometry in Microbiology*, Edited by: Kostrzewa M and Schuber S, 2016; 93–108.
59. Furniss RCD, Kostrzewa M, Mavridou DAI, Larrouy-Maumus G. The clue is in the lipid A: Rapid detection of colistin resistance. *PLoS Pathog* 2020; 16(4): e1008331.
60. Paskova V, Chudejova K, Sramkova A, Kraftova L, Jakubu V, Petinaki EA, Zemlickova H, Neradova K, Papagiannitsis CC, Hrabak J. Insufficient repeatability and reproducibility of MALDI-TOF MS-based identification of MRSA. *Folia Microbiol* 2020; 65: 895–900.
61. La Scola B, Raoult D, Bereswill S. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE* 2009; 4(11): e8041.
62. Sedláček I. *Escherichia* a *Shigella* – pro klinickou bakteriologii dva dlouho známé rody, přesto taxonomicky stále problematické. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2011; 20(3): 100–103.
63. Paauw A, Jonker D, Roeselers G, Heng JME et al. Rapid and reliable discrimination between *Shigella* species and *Escherichia coli* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol* 2015; 305: 446–452.
64. Li P, Xin W, Xia S, Luo Y, Chen Z, Jin D, Gao S et al. MALDI-TOF mass spectrometry-based serotyping of *V. parahaemolyticus* isolated from the Zhejiang province of China. *BMC Microbiology* 2018; 18:185.

65. Sedláček I. Taxonomie prokaryot, Masarykova universita, Brno, 2007
66. Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 1996; 60(2): 407–438.
67. Prakash O, Verma M, Sharma P, Kumar M, Kumari K, Singh A, Kumari H, Jit S, Gupta SK, Khanna M, Lal R. Polyphasic approach of bacterial classification — An overview of recent advances. *Indian J Microbiol* 2007; 47(2): 98–108.
68. Farmer JJ III. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification, in *Manual of Clinical Microbiology* 2003. 8th ed, pp 636–653.
69. Brenner DJ. Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of enteric bacteria. *Int J of Syst Bacteriol* 1973; 23 (4): 298–307.
70. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R *et al.* Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 1971; 56, 341–361.
71. Rabinow P. *Making PCR: A Story of Biotechnology*. Chicago: University of Chicago Press, 1996.
72. Kary B. Mullis – Nobel Lecture: The Polymerase Chain Reaction.
73. Švec P, Pantůček R, Petráš P, Sedláček I, Nováková D. Identification of *Staphylococcus* spp. using (GTG)₅-PCR fingerprinting. *Syst Appl Microbiol* 2010; 33: 451–456.
74. Švec P, Nováková D, Žáčková L, Kukletová M, Sedláček I. Evaluation of (GTG)₅-PCR for rapid identification of *Streptococcus mutans*. *Anton Leeuw Int J G* 2008; 94: 573–579.
75. Williams RC. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). *Yearbook Of Physical Anthropology* 1989; 32: 159–184.
76. Kiratisin P, Li L, Murray PR, Fischer SH. Identification of bacteria recovered from clinical specimens by 16S rRNA gene sequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22: 628–631.
77. Yair Motro, Jakob Moran-Gilad. Next-generation sequencing applications in clinical bacteriology *Biomol Detect Quantif*. 2017; 14: 1–6.

78. CDC (Centers for Disease Control and Prevention): Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states, 2007. *Morbidity & Mortality Weekly Rep* 2008; 57: 366–370.
79. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrheal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Org* 2003; 81: 197–207.
80. Zilbauer M, Dorrell N, Wren BW, Bajaj-Elliott M. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 123–129.
81. Moreno GS, Griffiths PL, Connerton IF, Park RW. Occurrence of campylobacters in small domestic and laboratory animals. *J Appl Bacteriol* 1993; 75: 49–54.
82. Ono K, Masaki H, Tokumaru Y. Isolation of *Campylobacter* spp. from slaughtered cattle and swine on blood-free selective medium. *J Vet Med Sci* 1995; 57: 1085–1087.
83. Wesley IV, Wells SJ, Harmon KM, Green A, Schroeder-Tucker L, Glover M, Siddique I. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1994–2000.
84. Oporto B, Esteban JI, Aduriz G, Juste RA, Hurtado A. Prevalence and diversity of thermophilic campylobacters in cattle, sheep and swine farms. *J Appl Microbiol* 2007; 103: 977–984.
85. Woldemariam E, Bouma A, Vernooij JC, Stegeman A. The sensitivity and specificity of fecal and cecal culture for the detection of *Campylobacter* in Dutch broiler flocks quantified by Bayesian analysis. *Int J Food Microbiol* 2008; 121: 308–312.
86. Hong J, Jung WK, Kim JM, Koo HC, Ser J, Park YH. Quantification and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw chicken meats using a real-time PCR methods. *J Food Prot* 2007; 70: 2015–2022.
87. Kopecký O, Lukešová Š, Horáček J, Pařízková R. *Campylobacter* sepsis with multiple organ failure in IgG subclass deficiency. *Folia Microbiol* 2006; 51: 604–608.
88. Votava M. *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun, Brno, 2003.

89. Lai-King NG, Bin Kingombe CI, Yan W, Taylor DE, Hiratsuka K, Malik N, Garcia MM. Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4558–4563.
90. Fermér C, Engvall EO. Specific DNA identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *C. upsaliensis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3370–3373.
91. Khan AM, Faruque AS, Hossain MS, Sattar S, Fuchs GJ, Salam MA. *Plesiomonas shigelloides*-associated diarrhea in Bangladeshi children: a hospital-based surveillance study. *J Trop Pediatr* 2004; 50: 354–356.
92. Gascón J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. *Digestion* 2006; 73 (Suppl. 1), 102–108.
93. González-Rey C, Svenson SB, Bravo L, Siitonen A, Pasquale V, Dumontet S, Ciznar I, Krovacek K. Serotypes and anti-microbial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* isolates from humans, animals and aquatic environments in different countries. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 129–139.
94. Aldová E, Shimada T. New O and H antigens of the International Antigenic Scheme for *Plesiomonas shigelloides*. *Folia Microbiol* 2000; 45: 301–304.
95. Borenshtein D, Schauer DB. The genus *Citrobacter* 2006; 90–98. In: Dworkin M et al (Eds): *The Prokaryotes*, 3rd ed, Vol 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. Springer.
96. Murray PR, Holmes B, Auken HM. *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, and other Enterobacteriaceae 2005; 1474–1506. In: Borriello SP, Murray R, Funke G (eds) *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections* (10th ed), bacteriology Vol 2. ASM Press, Washington (DC).
97. Ogunshe AA, Fawole AO, Ajayi VA. Microbial evaluation and public health implications of urine as alternative therapy in clinical pediatric cases: health implication of urine therapy. *Pan Afr Med J* 2010; 25(5): 12.
98. Janda JM, Abbott SL, Cheung WK, Hanson DF. Biochemical identification of citrobacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994; 32(8): 1850–1854.

99. Hájek V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. Int J Syst Bacteriol 1976; 26(4): 401–408.
100. Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere A, Haesebrouck F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. Int J Syst Evol Microbiol 2005; 55: 1569–1573.
101. Varaldo PE, Kilpper-Bälz R, Biavasco F, Satta G, Schleifer KH. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. Int J Syst Bacteriol 1988; 38: 436–439.
102. Murray AK, Lee J, Bendall R, Zhang L, Sunde M, Schau Slettemeås J, Gaze W, Page AJ, Vos M. *Staphylococcus cornubiensis* sp. nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* Group (SIG). Int J Syst Evol Microbiol 2018; 68(11): 3404–3408.
103. Perreten V, Kania SA, Bemis D. *Staphylococcus ursi* sp. nov., a new member of the '*Staphylococcus intermedius* group' isolated from healthy black bears. Int J Syst Evol Microbiol 2020; 70(8): 4637–4645.
104. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. J Clin Microbiol 2010; 48: 765–769.
105. Zubeir IE, Kanbar T, Alber J, Lämmle C, Akineden O, Weiss R, Zschöck M. Phenotypic and genotypic characteristics of methicillin/oxacillin-resistant *Staphylococcus intermedius* isolated from clinical specimens during routine veterinary microbiological examinations. Vet Microbiol 2007; 121: 170–176.
106. Bond R, Loeffler A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. J Small Anim Pract 2012; 53: 147–154.
107. Kmiecik W, Szewczyk EM. Are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* strains a growing threat for humans? Folia Microbiol 2018; 63(6): 743–747.
108. Grimont PAD, Weil FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for reference and research on Salmonella, 9th ed., 2007.

109. Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Res Microbiol* 2014; 165(7): 526–530.
110. Beneš J. *Infekční lékařství*, 2009.
111. Vandamme P, Van Doorn LJ, al Rashid ST, Quint WG, van der Plas J, Chan VL, On SL. *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Véron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47(4): 1055-1060.
112. Urbášková P, Dědičová D, Žemličková H, Wünschová M, Jakubů V, Karpíšková R, Petráš P a pracovníci 85 mikrobiologických laboratoří ČR. Stav citlivosti k antibiotikům u *Salmonella* spp. v České republice. *Zprávy CEM* 2001; 10(2): 70–73.
113. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0, 2013. Dostupné online: <http://www.eucast.org/>
114. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty two informational supplement. CLSI Document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, Pa, 2012.
115. Hrabák J, Žemličková H, Bergerová T, Urbášková P. Interpretace výsledků vyšetření citlivosti enterobakterií u producentů širokospektrých β -laktamáz (ESBL), β -laktamáz AmpC a karbapenemáz. *Zprávy CEM* 2010; 19(6-7): 194–196.
116. Brenner DJ, Grimont PA, Steigerwalt AG, Fanning GR, Ageron E, Riddle CF. Classification of citrobacteria by DNA hybridization: designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43(4): 645–658.
117. Brenner DJ, O'Hara CM, Grimont PA, Janda JM, Falsen E, Aldova E, Ageron E, Schindler J, Abbott SL, Steigerwalt AG. Biochemical identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of

- Citrobacter gillenii* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 10) and *Citrobacter murlinae* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 11). J Clin Microbiol 1999; 37(8): 2619–2624.
118. Abu Elamreen FH, Abed AA, Sharif FA. Detection and identification of bacterial enteropathogens by polymerase chain reaction and conventional techniques in childhood acute gastroenteritis in Gaza, Palestine. Int J Infect Dis 2007; 11(6): 501–507.
119. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol. 1997; 35(10): 2568–2572.
120. Koláčková I, Karpíšková R. Species level identification of thermotolerant campylobacters. Vet Med Czech 2005; 50: 543–547.
121. Johnsen G, Zimmerman K, Lindstedt BA, Vardund T, Herikstad H, Kapperud G. Intestinal carriage of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* among cattle from south-western Norway and comparative genotyping of bovine and human isolates by amplified-fragment length polymorphism. Acta Vet Scand 2006; 48(1): 4.
122. Mandrell RE, Harden LA, Bates A, Miller WG, Haddon WF, Fagerquist CK. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 6292–6307.
123. Fagerquist CK, Miller WG, Harden LA, Bates AH, Vensel WH, Wang G, Mandrell RE. Genomic and proteomic identification of a DNA-binding protein used in the “fingerprinting” of *Campylobacter* species and strains by MALDI-TOFMS protein biomarker analysis. Analyt Chem 2005; 77: 4897–4907.
124. Jarman KH, Daly DS, Petersen CE, Saenz AJ, Valentine NB, Wahl KL. Extracting and visualizing matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectral fingerprints. Rapid Commun Mass Spectrom 1999; 13(15): 1586–1594.
125. Bessède E, Solecki O, Sifré E, Labadi L, Mégraud F. Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser

- desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2011; 17(11): 1735–1739.
126. Nielsen HL, Mølvaadgaard M, Nielsen H, Kostrzewa M. Identification and Differentiation of Highly Diverse *Campylobacter concisus* Strains using the MALDI Biotyper. Clin Microbiol 2016; 5: 230.
127. Hsieh YH, Wang YF, Moura H, Miranda N, Simpson S, Gowrishankar R, Barr J, Kerdahi K, Sulaiman IM. Application of MALDI-TOF MS Systems in the Rapid Identification of *Campylobacter* spp. of Public Health Importance. J AOAC Int 2018; 101(3): 761–768.
128. Lawton SL, Weis AM, Byrne BA, Fritz H, Taff CC, Townsend AK, Weimer BC, Mete A, Wheeler S, Boyce WM. Comparative analysis of *Campylobacter* isolates from wild birds and chickens using MALDI-TOF MS, biochemical testing, and DNA sequencing. J Vet Diagn Invest 2018; 30: 354–361.
129. Ziino G, Stefania Marotta SM, Giarratana F, Giuffrida A, Panebianco F. Reliability Evaluation of MALDI-TOF MS Associated with SARAMIS Software in Rapid Identification of Thermophilic *Campylobacter* Isolated from Food. Food Analytical Methods 2019; 12: 1128–1132.
130. Moliner C, Ginevra Ch, Jarraud S, Flaudrops Ch, Bedotto M, Couderc C, Etienne J, Fournier PE. Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. J Med Microbiol 2010; 59: 273–284.
131. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl Environ Microbiol 2008; 74(17): 5402–5407.
132. Koudelka Š, Gelbíčová T, Procházková M, Karpíšková R. Lineage and serotype identification of *Listeria monocytogenes* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spektrometry. Czech J Food Sci 2018; 36(6): 452–458.
133. Kuhns M, Zautner AE, Rabsch W, Zimmermann O, Weig M, Bader O, Groß U. Rapid discrimination of *Salmonella enterica* serovar Typhi from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. PLoS One 2012; 7(6):e40004.

134. Deng J, Fu L, Wang R, *et al.* Comparison of MALDI-TOF MS, gene sequencing and the Vitek 2 for identification of seventy-three clinical isolates of enteropathogens. *J Thorac Dis* 2014; 6(5): 539–544.
135. Gavin PJ, Warren JR, Obias AA, Collins SM, Peterson LR. Evaluation of the Vitek 2 system for rapid identification of clinical isolates of gram-negative bacilli and members of the family Streptococcaceae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21(12): 869–874.
136. Becker B, Weiss C, Holzappel W. An evaluation of the use of three phenotypic test- systems for biochemical identification of Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae. *Food Control* 2009; 20: 815–821.
137. Khot PD, Couturier MR, Wilson A, Croft A, Fisher MA. Optimization of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis for bacterial identification. *J Clin Microbiol* 2012; 50(12): 3845–3852.
138. Guo L, Ye L, Zhao Q, Ma Y, Yang J, Luo Y. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *J Thorac Dis* 2014; 6(5): 534–538.
139. O'Hara CM, Roman SB, Miller JM. Ability of commercial identification systems to identify newly recognized species of *Citrobacter*. *J Clin Microbiol* 1995; 33(1): 242–245.
140. Delgado G, Souza V, Morales R, Cerritos R, Gonzalez-Gonzalez A, Méndez JL, Vázquez V, Cravioto A. (2013) Genetic characterization of atypical *Citrobacter freundii*. *PLoS ONE* 2013; 8(9):e74120.
141. Murugaiyan J, Walther B, Stamm I, Abou-Elnaga Y, Brueggemann-Schwarze S, Vincze S, Wieler LH, Lübke-Becker A, Semmler T, Roesler U. Species differentiation within the *Staphylococcus intermedius* group using a refined MALDI-TOF MS database. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(10): 1007–1015.
142. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6): 1661–1669.
143. Tabit FT. Advantages and limitations of potential methods for the analysis of bacteria in milk: a review. *J Food Sci Technol* 2016; 53(1): 42–49.
144. Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol* 2009; 47(2): 469–471.

145. Van Hoovels L, Vankeerberghen A, Boel A, Van Vaerenbergh K, De Beenhouwer H. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. J Clin Microbiol 2006; 44(12): 4609–4612.
146. Bannoehr J, Ben Zakour NL, Waller AS, Guardabassi L, Thoday KL, van den Broek AH, Fitzgerald JR. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. J Bacteriol 2007; 189(23): 8685–8692.
147. Pompilio A, DeNicola S, Crocetta V, Guarnieri S, Savini V, Carretto E, Di Bonaventura G. New insights in *S. pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain. BMC Microbiol 2015; 15: 109.
148. Somayaji R, Priyantha MA, Rubin JE, Church D. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. Diagn Microbiol Infect Dis 2016; 85(4): 471–476.
149. Kmieciak W, Szewczyk EM. Are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* strains a growing threat for humans? Folia Microbiol 2018; 63(6): 743–747.
150. Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice, červen 2012. Zprávy CEM 2012; 21(6-7): 220.
151. Jones TF, Ingram LA, Cieslak PR, Vugia DJ, Tobin-D'Angelo M *et al.* 2008. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. J Infect Dis 2008; 198: 109–114.
152. Crump JA, Medalla FM, Joyce KW, Krueger AL, Hoekstra RM, *et al.* Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: National antimicrobial resistance monitoring system, 1996 to 2007. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(3): 1148–1154.
153. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2010. EFSA Journal 2012; 10(3): 2598.
154. Urbášková P, Dědičová D, Žemličková H, Wünschová M, Jakubů V, Karpíšková R, Petráš P a pracovníci 85 mikrobiologických laboratoří ČR. Stav citlivosti k

antibiotikům u *Salmonella* spp. v České republice. Zprávy CEM 2001; 10(2): 70–73.

155. Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B, Granier SA, Lucarelli C, Porrero MC, Jakubczak A, Threlfall EJ, Mevius DJ. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i: in Europe: a new pandemic strain? Euro Surveill 2010; 15(22).

9. Přílohy

9.1. Příloha 1. Seznam obrázků

Obrázek 1a. Přístroj MALDI-TOF MS microflex™ Bruker Daltonic (SZÚ, Praha)	13
Obrázek 1b. Princip MALDI-TOF MS	14
Obrázek 2. Strukturní vzorce nejčastěji používaných matric v hmotnostní spektrometrii	15
Obrázek 3. Destička na fixaci vzorku při MALDI-TOF MS (MALDI target plate)	16
Obrázek 4. Příklad hmotnostních spekter tří různých druhů rodu <i>Campylobacter</i>	17
Obrázek 5. Metody identifikace mikroorganismů	23
Obrázek 6. Výsledky PCR detekce specifického produktu <i>C. jejuni</i> a <i>C. coli</i>	34
Obrázek 7. Dendrogram vytvořený na základě spekter kmenů <i>C. jejuni</i> a <i>C. coli</i>	36
Obrázek 8. Dendrogram vytvořený na základě spekter kmenů <i>P. shigelloides</i>	37

9.2. Příloha 2. Seznam tabulek

Tabulka 1. Vyhodnocení identifikace dle hodnoty skóre MALDI-TOF MS	18
Tabulka 2. Výsledky identifikace u zkoumaných kmenů rodu <i>Campylobacter</i>	35
Tabulka 3. Reklasifikace původních druhů r. <i>Citrobacter</i> (biochemické metody)	38
Tabulka 4. Počet kmenů r. <i>Citrobacter</i> , biochemické metody × MALDI-TOF MS	39
Tabulka 5. Výsledek identifikace druhů <i>S. intermedius</i> a <i>S. pseudintermedius</i>	40
Tabulka 6. Sérovary <i>Salmonella enterica</i> v souboru 637 kmenů salmonel	42
Tabulka 7. Rozmezí minimálních inhibičních koncentrací (MIC) antibiotik	43
Tabulka 8. Vzory rezistence u sérovarů <i>Salmonella enterica</i>	44