proLékaře.cz | 11.11.2026

PŮVODNÍ PRÁCE

Detekce DNA *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae* v klinickém materiálu metodou real-time PCR

Vacková Z.[1, 2], Lžičařová D.[1, 3], Stock N.K.[1, 4, 5], Kozáková J.[1]

[1]Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav, Praha
[2]3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
[3]Ústav lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol
[4]European Program for Public Health Microbiology (EUPHEM), ECDC, Stockholm, Sweden
[5]Institute of Hygiene and Microbiology, Julius-Maximilians-University, Würzburg, Germany

SOUHRN

Cílem práce bylo zavedení molekulární real-time PCR metodiky doporučené CDC (Centers for Disease Control and Prevention) pro účely detekce bakterií *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae* v klinických (kultivačně negativních) vzorcích při podezření na invazivní bakteriální onemocnění. Klinické vzorky jsou zasílány do NRL pro meningokokové nákazy Oddělení bakteriálních vzdušných nákaz CEM SZÚ z různých regionů České republiky. Jedná se především o likvor, nesrážlivou krev či sérum, výjimečně sekční materiál. NRL má zavedenou molekulární diagnostiku těchto bakteriálních původců menigitid a sepsí z klinických vzorků již od roku 1999. Původně se jednalo o seminested polymerázovou řetězovou reakci s elektroforetickým vyhodnocením. V roce 2014 byla implementována molekulární metoda real-time PCR s kvalitativním hodnocením.

KLÍČOVÁ SLOVA:

rt-PCR detekce *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae* – rt-PCR detekce původců bakteriálních menigitid a sepsí

ABSTRACT

Vacková Z., Lžičařová D., Stock N. K., Kozáková J.: Real-time PCR detection of *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical specimens

The study aim was to implement a molecular real-time polymerase chain reaction (PCR) assay recommended by the CDC (Centers for Disease Control and Prevention) for the detection of *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in clinical (culture negative) specimens from patients with suspected invasive bacterial disease. Clinical specimens are referred to the National Reference Laboratory (NRL) for Meningococcal Infections, Unit for Airborne Bacterial Infections, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health from various regions of the Czech Republic. Clinical specimens are, in particular, cerebrospinal fluid, anti-coagulated blood or serum and, exceptionally, post-mortem specimens. The NRL has implemented molecular diagnosis of these bacterial pathogens involved in meningitis and sepsis from clinical specimens since 1999. The first diagnostic method was semi-nested PCR followed by electrophoretic analysis. In 2014, a molecular qualitative real-time PCR assay was implemented.

KEYWORDS:

rt-PCR detection of *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* – rt-PCR detection of the agents of bacterial meningitis and sepsis

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 64, 2015, č. 4, s. 222–230

ÚVOD

Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae i *Haemophilus influenzae* patří celosvětově k velice významným patogenům. Jedná se o bakterie evolučně blízce nepříbuzné, nicméně sdílející některé vlastnosti významné pro ekologii a chování v organismu hostitele. Především jde o antigenní variabilitu určující velké množství séroskupin a sérotypů těchto bakterií, celosvětové rozšíření s odlišnou distribucí séroskupin či sérotypů, nebo schopnost vyvolávat různé formy interakcí s lidským organismem. Často představují běžnou bakteriální flóru, jindy vyvolávají lehká respirační onemocnění. Jsou však schopny vyvolat i život ohrožující invazivní onemocnění, jakými jsou meningitidy, bakterémie, sepse či pneumonie.

proLékaře.cz | 11.11.2026

Implementovaná molekulární metoda je určena pro diagnostiku invazivních bakteriálních onemocnění. Umožňuje detekci agens v kratším časovém intervalu, detekuje i nízkou koncentraci DNA ve vzorku (včetně kultivačně negativních, i několik dní po zahájení antibiotické terapie).
Národní referenční laboratoř pro meningokokové nákazy (NRL MEN) Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz Centra epidemiologie a mikrobiologie (CEM) Státního zdravotního ústavu (SZÚ), má již od roku 1999 zavedenu seminested polymerázovou řetězovou reakci (PCR) pro detekci *Neisseria meningitidis* se sérotypizací B a C [1]. Roku 2003 byla metodika rozšířena o detekci *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* a sérotypizaci *Neisseria meningitidis* o séroskupiny A, W, Y [2]. Implementovaná metoda real-time PCR (rt-PCR) v rámci Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz CEM SZÚ nahradí původní metodiku identifikace *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* a *Haemophillus influenzae* přímo z klinických vzorků při podezření na invazivní bakteriální onemocnění. Tato metodika je společně s ostatními nabízena lékařům. Doporučení na typ, odběr a transport materiálu viz http://www.szu.cz/odd-vzdusne-nakazy-doporucene-postupy.
Principem této kvalitativní metody rt-PCR je amplifikace úseku DNA obsahujícího cílovou sekvenci a detekce této cílové sekvence pomocí hybridizace oligonukleotidu značeného fluorescenčním barvivem. Intenzita fluorescence je úměrná množství amplifikovaného úseku v reakci, měří se průběžně po dobu trvání reakce za použití optického detekčního systému rt-PCR cykléru. Jako cílové sekvence pro PCR identifikaci *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* i *Haemophillus influenzae* mohou být použity různé geny, jenž dané bakteriální genomy specificky obsahují. Jedná se především o geny *ctrA, crgA, sodC, ply, psaA, lytA, ompP2, hpd, bexA* [3-8]. Pro každé bakteriální agens byl pro detekci vybrán jeden specifický gen, jednalo se vždy o gen vyskytující se v ideálním případě specificky, vždy pouze u daného druhu napříč séroskupinami či sérotypy a nezávisle na přítomnosti či nepřítomnosti pouzdra. Metoda je navržena na detekci cílové sekvence genu *sodC* u *Neisseria meningitidis*. Tento gen je obsažen v genomu opouzdřených i neopouzdřených kmenů. SodC gen kóduje Cu, Zn superoxiddismutázu. Detekce *Haemophilus influenzae* je namířena na cílovou sekvenci genu *hpd* kódujícího protein D. Jedná se o gen přítomný v genomu opouzdřených i neopouzdřených kmenů. Identifikace *Streptococcus pneumoniae* probíhá detekcí cílové sekvence genu lytA kódujícího autolysin. Sekvence jsou vysoce specifické pro příslušné bakteriální druhy. Použití vybraných genů při PCR identifikaci *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae* je celoevropsky doporučeno CDC [9].

MATERIÁL A METODIKA

Kmeny

Pro potřeby testování metodiky, možných nespecifických reakcí i velice důležitou přípravu pozitivních interních kontrol pro rt-PCR se použily kmeny ze sbírek NRL pro meningokokové nákazy, NRL pro streptokokové nákazy, NRL pro hemofilové nákazy, vše Oddělení bakteriálních vzdušných nákaz CEM SZÚ v Praze a České národní sbírky typových kultur (CNCTC) SZÚ v Praze. Testování bylo zaměřeno na kmeny rodů *Neisseria, Haemophilus* a *Streptococcus* společně s kmeny rodově příbuzných bakterií či kmeny představující riziko záměny při klinických projevech. Celkově bylo testováno 70 kmenů (tab. 1).

Klinické vzorky

Při procesu implementace rt-PCR metody určené k detekci DNA *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae* v klinickém materiálu byly použity primárně sterilní klinické kultivačně negativní vzorky zasílané do NRL pro meningokokové nákazy s požadavkem identifikace jednoho či všech tří zmiňovaných patogenů při podezření na invazivní bakteriální onemocnění.
Druhy testovaného materiálu: mozkomíšní mok, krev nesrážlivá, krev srážlivá – sérum, pleurální tekutina, hemokultivační nádobky Bact/Alert, pitevní materiál (petechie). Metodika je však validována pro mozkomíšní mok a nesrážlivou krev, ostatní typy materiálu byly testovány jen v minimálním počtu vzorků. Celkově bylo testováno 55 klinických vzorků (viz tab. 1).

Postup izolace DNA

Postup je jednotný pro izolaci z klinických materiálů i bakteriálních kultur. Postup izolace DNA je prováděn pomocí izolačního kitu QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN), po předchozí enzymatické preinkubaci. Využívají se enzymy lyzozym (Sigma Aldrich), mutanolyzin (Sigma Aldrich) a proteináza K (QIAGEN) [10].
Izolovaná DNA se skladuje krátkodobě po dobu vyšetřování vzorku při 2–8 °C, za účelem dlouhodobé archivace vyšetřeného materiálu při -20 °C.

Postup provedení rt-PCR reakce

Reakční směs použitá pro PCR má následující složení: TaqMan Universal Master Mix kit (ABI), specifické primery a značená sonda (Generi Biotech). Sekvence a finální koncentrace použitých primerů a sond byly přijaty podle CDC doporučení [9] a jsou uvedeny v tabulce 2. Sondy jsou značené FAM-BHQ1. K 16 µl reakční směsi (objemové složení reakční směsi: 10 µl master mixu + 2 µl forward primeru + 2 µl reverse primeru + 2 µl sondy) se přidávají 4 µl izolované DNA vzorku či kontroly. Amplifikace byla prováděná v Rt-PCR termocykléru CFX 96 (BIO-RAD) s detekčním systémem tvořeným 6 fotodiodami LED (rozmezí vlnových délek pro oblast excitace 450–684 nm, rozmezí vlnových délek pro oblast emise 515–730 nm). Byl použit následující amplifikční program s detekcí v kroku hybridizace: počáteční denaturace 50 °C/2 min, 95 °C/10 min, následně opakování 45 cyklů 95 °C/15 sec, 60 °C/1 min (detekce) a nakonec ochlazení na 4 °C do zastavení.

Každý vzorek je pro každou sekvenci testován v tripletu. Pro každou sekvenci jsou zařazeny tři kontroly (negativní, izolační, pozitivní) testované v tripletu. Při každém pokusu se tedy používá neznámý klinický vzorek (izolovaná DNA z neznámého klinického vzorku), negativní izolační kontrola (NIK – vzorek PCR H_2O, která prošla postupem izolace DNA souběžně s klinickým vzorkem), negativní kontrola (NTC – vzorek PCR

proLékaře.cz | 11.11.2026

Tabulka 1. Souhrnný přehled testovaných kmenů a klinických vzorků

Table 1. Summary review of strains and clinical specimens tested

Kmen	Číslo kmene	Ct *sodC*			Průměr Ct	Ct *hpd*			Průměr Ct	Ct *lytA*			Průměr Ct
Aggregatibacter aphrophilus	65/13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Aggregatibacter segnis	44/10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Branhamella catarrhalis	64/93	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Corynebacterium striatum	142/2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Haemophilus parahaemolyticus	63/10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Haemophilus aphrophilus	43/10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Haemophilus haemolyticus	48/07	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Haemophilus influenzae	62/09a	neg	neg	neg	neg	14,00	14,40	14,21	14,20	neg	neg	neg	neg
Haemophilus influenzae	14 studie HEM	neg	neg	neg	neg	12,00	11,00	11,00	11,33	neg	neg	neg	neg
Haemophilus influenzae	19 studie HEM	neg	neg	neg	neg	12,00	11,00	11,00	11,33	neg	neg	neg	neg
Haemophilus infuenzae A	CNCTC 6330	neg	neg	neg	neg	15,00	15,34	15,00	15,11	neg	neg	neg	neg
Haemophilus infuenzae B	35/13	neg	neg	neg	neg	15,00	15,60	15,39	15,33	neg	neg	neg	neg
Haemophilus infuenzae C	CNCTC 6459	neg	neg	neg	neg	14,00	15,00	15,00	14,67	neg	neg	neg	neg
Haemophilus infuenzae D	20115 FINSKO	neg	neg	neg	neg	14,00	15,00	15,00	14,67	neg	neg	neg	neg
Haemophilus infuenzae E	CNCTC 6472	neg	neg	neg	neg	17,00	17,00	17,00	17,00	neg	neg	neg	neg
Haemophilus infuenzae F	34/13	neg	neg	neg	neg	15,00	14,00	15,00	14,67	neg	neg	neg	neg
Haemophilus infuenzae NT	1/14	neg	neg	neg	neg	14,63	14,00	14,00	14,21	neg	neg	neg	neg
Haemophilus non-influenzae	26 studie HEM	neg	neg	neg	neg	30,00	31,00	31,00	30,67	neg	neg	neg	neg
Haemophilus non-influenzae	30A studie HEM	neg	neg	neg	neg	32,00	33,00	32,00	32,33	neg	neg	neg	neg
Haemophilus parainfluenzae	59/13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Listeria monocytogenes	6511 CNCTC	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria cinerea	N415	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria gonorrhoeae	51/89	neg	neg	40,38	40,38	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria lactamica	5518 CNCTC	neg	42,00	neg	42,00	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria meningitidis 29E	76/88	15,74	15,82	15,62	15,73	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria meningitidis A	1027	16,20	16,17	15,98	16,12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria meningitidis B	323/97	17,31	17,01	17,23	17,18	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria meningitidis C	1/14	16,82	16,36	16,60	16,59	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria meningitidis PA	33/13	17,23	17,14	17,04	17,14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria meningitidis W	77/12	16,93	16,60	16,49	16,67	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria meningitidis X	71/88	16,20	16,27	16,32	16,26	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria meningitidis Y	1916	16,71	16,71	16,68	16,70	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Neisseria sicca	N3834	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Staphylococcus aureus	6719	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Streptococcus agalactiae	195/2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Streptococcus salivarius	211/2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Streptococcus pneumoniae 1	707/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	20,33	20,33	nd	20,33
Streptococcus pneumoniae 10A	155850	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	17,65	18,14	nd	17,90
Streptococcus pneumoniae 11A	13/13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,41	18,57	nd	18,49
Streptococcus pneumoniae 12F	155587	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,74	18,70	nd	18,72
Streptococcus pneumoniae 15A	124/2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,95	18,49	nd	18,72
Streptococcus pneumoniae 17F	61/2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	19,41	19,73	nd	19,57
Streptococcus pneumoniae 18C	189/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	19,05	18,77	nd	18,91
Streptococcus pneumoniae 19A	439/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,23	19,13	nd	18,68
Streptococcus pneumoniae 19F	638/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	22,95	23,61	nd	23,28
Streptococcus pneumoniae 22F	76/2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,80	19,71	nd	19,26

proLékaře.cz | 11.11.2026

Streptococcus pneumoniae 23A	152/2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	19,42	19,93	nd	19,68
Streptococcus pneumoniae 23F	109/2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,23	19,13	nd	18,68
Streptococcus pneumoniae 24B	639/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	19,22	19,06	nd	19,14
Streptococcus pneumoniae 3	435/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	19,94	20,21	nd	20,08
Streptococcus pneumoniae 35F	177/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	21,69	21,91	nd	21,80
Streptococcus pneumoniae 4	199/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,24	18,14	nd	18,19
Streptococcus pneumoniae 6A	208/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,54	18,96	nd	18,75
Streptococcus pneumoniae 6B	125/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,03	18,24	nd	18,14
Streptococcus pneumoniae 6C	179/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,25	17,86	nd	18,06
Streptococcus pneumoniae 7F	201/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	19,20	19,03	nd	19,12
Streptococcus pneumoniae 8	390/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	17,15	17,54	nd	17,35
Streptococcus pneumoniae 9N	640/2012	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	17,29	17,21	nd	17,25
Streptococcus pneumoniae 9V	79/2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,90	19,08	nd	18,99
Streptococcus pneumoniae14	12/13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	17,83	17,91	nd	17,87
Streptococcus mitis	459/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	38,00	37,53	nd	37,77
Streptococcus mitis	497/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Streptococcus mitis	189/13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Streptococcus mitis	155681	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Streptococcus mitis	276/13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Streptococcus mitis	316/13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Streptococcus mitis	271/13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Streptococcus mitis	457/12	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	11,00	11,00	11,54	11,18
Streptococcus mitis	502/13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Streptococcus oralis	155888	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Typ klinického materiálu	**číslo klin.vz.**	**ct *sodC***			**průměr Ct**	**ct *hpd***			**průměr Ct**	**ct *lytA***			**průměr Ct**
Likvor	16/14	38,04	38,00	39,00	38,35	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	17/14	31,00	29,00	34,00	31,33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Sérum	20/14	neg	neg	neg	neg*	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	127/04	37,00	38,00	37,00	37,33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Pleurální tekutina	4/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	35,00	33,00	33,00	33,67
Sérum	5/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg*
Likvor	120/04	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg*	neg	neg	neg	neg
Sérum	29/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	30/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Krev	31/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	41/14	31,07	31,1	30,57	30,91	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Sekční materiál (petechie)	42/14	30,00	30,00	30,00	30,00	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Sekční materiál (petechie)	43/14	27,00	27,00	27,00	27,00	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Bact/Alert	43b/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	44/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	24,00	24,00	24,00	24,00
Nesrážlivá krev	45/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	46/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	47/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	48/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Krev	49/14	34,00	35,00	35,00	34,67	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	50/14	37,00	38,02	37,00	37,34	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Sérum	51/14	29,00	29,00	30,00	29,33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	52/14	30,00	29,00	35,00	31,33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

proLékaře.cz | 11.11.2026

Likvor	53/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	54/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	55/14	37,00	37,00	38,00	37,33	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Nesrážlivá krev	56/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	57/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	58/14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Bact/Alert	510/14STR	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	58/2011	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	28,77	29,09	28,94	28,93
Likvor	002/2012	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	17,45	17,71	17,30	17,49
Nesrážlivá krev	26830/2012	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	33,98	34,06	32,00	33,35
Likvor	51052/2012	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	18,57	17,25	18,09	17,97
Likvor	54272/2012	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	27,12	23,83	24,49	25,15
Likvor	55820/2012	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	21,38	21,13	22,14	21,55
Likvor	7/05	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg*	neg	neg	neg	neg
Likvor	011/2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	23,74	23,71	23,54	23,66
Likvor	11462/2013	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	30,69	30,81	31,10	30,87
Likvor	25/2014	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	29,88	29,71	29,82	29,80
Likvor	1/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	2/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	26,00	25,00	26,00	25,67
Likvor	3/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Nesrážlivá krev	4/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	7/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	26,77	26,60	26,68	26,68
Likvor	8/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Sérum	9/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	10/15	35,6	35,33	35,22	35,38	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	11/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	29,09	29,05	29,25	29,13
Sérum	12/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	13/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Nesrážlivá krev	14/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Nesrážlivá krev	15/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	16/15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Likvor	17/15	31,74	31,78	32,45	31,99	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Barevně označeny pozitivitní záchyty (červená – *N. meningitidis*, zelená – *H. influenzae*, modrá – *S. pneumoniae*)
neg* v těchto případech se liší výsledek seminested PCR a rt-PCR (seminested PCR pozitivní, rt-PCR negativní)

Positive capturing – colour marks (red – *N. meningitidis*, green – *H. influenzae*, blue – *S. pneumoniae*)
neg* in these cases the results seminested PCR and rt-PCR are different (seminested PCR positive, rt-PCR negative)

Tabulka 2. Primery a sondy pro rt-PCR

Table 2. Primers and probes for rt-PCR

Gen	Forward primer	Finální koncentace nM	Reverse primer	Finální koncentace nM	Sonda (modifikace FAM-BHQ1)	Finální koncentace nM
sodC	5´-GCACACTTAGGTGATTTAC CTGCAT-3´	300	5´-CCACCCGTGTGGATCATA ATAGA-3´	600	5´-CATGATGGCACAGCAACAAATCC TGTTT-3´	100
hpd	5´-GGTTAAATATGCCGATGGT GTTG-3´	100	5´-TGCATCTTTACGCACGGT GTA-3´	300	5´-TTGTGTACACTCCGTTGGTAAAAG AACTTGCAC-3´	100
lytA	5´-ACGCAATCTAGCAGATGA AGCA-3´	200	5´-TCGTGCGTTTTAATTCCA GCT-3´	200	5´-TGCCGAAAACGCTTGATACAGG GAG-3´	200
RNAaseP	5´-CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG-3´	400	5´-TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG-3´	400	5´-CCC CAG TCT CTG TCA GCA CTC CCT TC-3´	100

proLékaře.cz | 11.11.2026

bakteriálních kmenů *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* či *Streptococcus pneumoniae*). Kontrola extrakce a inhibice se provádí detekcí humánní DNA v každém klinickém vzorku. Kontrola je zařazena jako čtvrtá cílová sekvence *RNAsaP* [11] a testuje se ve stejném režimu (nutnost zařazení tří typů kontrol, pozitivní kontrolou je izolovaná DNA ze známého humánního klinického vzorku).

Přístupová čísla cílových sekvencí v GenBank
sodC – GenBank AE002098.2, *hpd* – Z35661.1, *lytA* – GenBank AE005672, *RNAsaP* – GenBank NM_006413

VALIDAČNÍ PARAMETRY METODY

Vytvoření standardní křivky a stanovení odvozených charakteristik rt-PCR testu
Pro vytvoření standardní křivky byla provedena rt-PCR měření podle popsaného protokolu v sérii ředění DNA o známé počáteční koncentraci (měřeno spektrofotometrem Nanodrop 1000) s koeficientem 10. Standardní křivka byla vytvořena v programu BIO-RAD CFX Manager (v grafu na ose x vyneseny hodnoty dekadického logaritmu jednotlivých ředění, počáteční koncentrace označena jako 1, na ose y hodnoty C_t (cycle treshold) pro jednotlivá měření). Oblast linearity, směrnice přímky v oblasti linearity (slope), efektivita E a korelační koeficient R2 byly též stanoveny pomocí programu BIO-RAD CFX Manager.

Stanovení dolního limitu detekce (LLOD)
- Stanovení limitu detekce jako počtu kopií DNA v reakci a v objemové jednotce:
  Rt-PCR detekce DNA podle popsaného protokolu v sérii ředění DNA s koeficientem 10. Limit detekce byl odvozen od nejvyššího ředění, ve kterém byla DNA spolehlivě detekována (pozitivní amplifikace ve 2 ze 3 replikátů a zároveň ve 2 oddělených rt-PCR pokusech). Měření koncentrace DNA v neředěném vzorku bylo provedeno pomocí spektrofotometru (Nanodrop 1000), koncentrace v ředěných vzorcích byla odvozena výpočtem. Počet kopií DNA v objemové jednotce příslušného ředění byl odvozen výpočtem podle vzorce

$$\frac{(C_{DNA} \,.\, 6{,}023 \,.\, 1023)}{(\text{délka genomu} \,.\, 650)}$$

C_{DNA} = koncentrace DNA v příslušném ředění v jednotkách g/µl
$6{,}023 \,.\, 10^{23}$ = Avogadrova konstanta udávající počet částic v 1 molu látky
650 = průměrná molární hmotnost 1 páru bazí v molekule DNA (g/mol)
délka genomu = vyjádřená jako počet párů bazí (bp), délka genomu *Neisseria meningitidis* séroskupina B [12], délka genomu *Haemophilus influenzae* NT [13], délka genomu *Streptococcus pneumoniae* sérotyp 3 [14].
Počet kopií DNA v reakci pro příslušné ředění byl získán vynásobením počtu kopií DNA v objemové jednotce a počtu objemových jednotek v reakci podle uvedeného protokolu (4x).
- Stanovení limitu detekce v CFU (colony forming unit)/ml:
  Detekce rt-PCR DNA podle popsaného protokolu v sérii ředění (koeficient 10) živé bujónové kultury *N. meningitidis, H. influenzae* a *S. pneumoniae*. Limit detekce je odvozen od nejvyššího ředění, ve kterém byla spolehlivě detekována DNA, a od nejvyššího ředění, pro které byl pozorován pozitivní kultivační nález.

Neisseria meningitidis – použit kmen 58/14, séroskupina B, ze sbírky NRL MEN. Z čerstvé kultury (Čokoládový Müller Hinton agar – ČMH (BIO-RAD), inkubace v atmosféře se zvýšenou tenzí 5% CO_2, teplota 37 °C, 24 hod) připravena suspenze v Brain Heart Infusion – BHI (OXOID), stupeň zákalu 2 podle McFarlanda. Alikvóty po 1 ml suspenze byly zmrazeny při -70 °C. Z 1 alikvóty bylo připraveno 12–15 ředění (koeficient 10) ve sterilním BHI, z každého ředění vyočkováno 100 µl suspenze na ČMH agar, rozočkováno po celé ploše půdy a inkubováno za výše uvedených podmínek. Ve zbylé suspenzi byly bakterie usmrceny 10minutovou inkubací při teplotě 100 °C a následovala extrakce a rt-PCR detekce DNA podle výše popsaného protokolu.
Po proběhlé inkubaci byly pro jednotlivá ředění spočteny vyrostlé kolonie a podle výsledku rt-PCR pokusu bylo určeno nejvyšší ředění, ve kterém byla spolehlivě detekována bakteriální DNA (kritéria uvedena výše). Limit detekce byl vyjádřen jako počet CFU/ml v nejvyšším ředění, v němž byla spolehlivě detekována bakteriální DNA ve dvou nezávislých pokusech.
Haemophilus influenzae – použit kmen 1/14, netypovatelný NT, ze sbírky NRL HEM. Z čerstvé kultury (čokoládový selektivní agar pro hemofily (OXOID), inkubace v atmosféře se zvýšenou tenzí 5% CO_2, teplota 35 °C, 24 hod) připravena suspenze v Levinthalově bujónu, stupeň zákalu 0,5 podle McFarlanda, naředěna 10krát. Alikvóty po 1 ml naředěné suspenze zmrazeny při -70 °C. Postup při přípravě a zpracování série ředění viz *N. meningitidis*, použitá kultivační média a podmínky inkubace viz *H. influenzae*.
Streptococcus pneumoniae – použit kmen 199/12, sérotyp 4, ze sbírky NRL STR. Z čerstvé kultury (Columbia krevní agar (OXOID), 7 % beraních erytrocytů, inkubace v atmosféře se zvýšenou tenzí 5% CO_2 , teplota 35 °C, 24 hod) připravena suspenze v BHI, stupeň zákalu 0,5 podle McFarlanda, naředěna 10krát. Alikvóty po 1 ml naředěné suspenze zmrazeny při -70 °C. Postup při přípravě a zpracování série ředění viz *N. meningitidis*, použitá kultivační média a podmínky inkubace viz *S. pneumoniae*.

Stanovení přesnosti (opakovatelnosti, repeatability) v oblasti dolního limitu detekce
Pro stanovení přesnosti v oblasti dolního limitu detekce bylo provedeno měření nejnižšího ředění, v němž byla spolehlivě detekována DNA příslušného bakteriálního původce, v 10 opakováních. Z naměřených hodnot byl vypočten variační koeficient.

Stanovení mezilehlé přesnosti (reprodukovatelnosti, reproducibility)
Pro stanovení mezilehlé přesnosti byly využity hodnoty C_t pozitivních kontrol téže šarže získané při 20 různých měřeních. Pozitivní kontroly se stejně jako vzorek měří v tripletu, proto byl pro každé měření nejprve spočten

proLékaře.cz | 11.11.2026

aritmetický průměr tří získaných hodnot C_t, variační koeficient byl pak vypočten z 20 průměrných hodnot C_t spočtených pro jednotlivá měření.

Ověření senzitivity a specificity
Ověření senzitivity: Testováno s kulturami *N. meningitidis, H. influenzae* a *S. pneumoniae* (viz tab 1). Ověření specificity in-silico: Provedeno pomocí NCBI BLAST.
Experimentální ověření specificity: Ověřeno s kulturami příbuzných bakteriálních druhů a druhů, které mohou být původci invazivních bakteriálních onemocnění (viz tab. 1).

Interpretace výsledků rt-PCR
Probíhá hodnocení hodnot C_t (cycle treshold). Vyšetření se považuje za validní, pokud hodnota C_t pozitivních kontrol odpovídá hodnotám naměřeným při jejich testování (používáno v rozmezí 30–36), NTC kontrola a negativní izolační kontrola jsou analytickým systémem vyhodnoceny jako negativní (NT – no template) a ve vzorku je detekována humánní DNA (pozitivita pro cílovou sekvenci *RNAsaP*).
Výsledek vyšetření vzorku se hodnotí jako pozitivní pro příslušnou cílovou sekvenci, pokud hodnota C_t je menší než 40 alespoň ve dvou ze tří replikátů.
Výsledek vyšetření vzorku se hodnotí jako negativní pro příslušnou cílovou sekvenci, pokud je vzorek analytickým systémem vyhodnocen jako negativní (NT – no template) nejméně ve dvou ze tří replikátů a pokud se při kontrole extrakce a inhibice ve vzorku prokáže přítomnost humánní DNA (cílová sekvence *RNAsaP*).

VÝSLEDKY VALIDACE A TESTOVÁNÍ

Stanovení dolního limitu detekce – počet kopií DNA v reakci a v objemové jednotce
Pro stanovení LLOD pro druh *Neisseria meningitidis* (sodC) byl použit kmen 323/97, sérotyp B. Hodnota LLOD byla stanovena s výsledkem 1,21 . 10^2 kopií/µl, což odpovídá 4,8 . 102 kopií v reakci (podle protokolu – 4 µl templátu v reakčním objemu 20 µl).
Pro stanovení LLOD pro druh *Haemophilus influenzae* (hpd) byl použit kmen 1/14, netypovatelný kmen. Hodnota LLOD byla 52,2 kopií/µl, to odpovídá 208,8 kopií v reakci.
Pro stanovení LLOD pro druh *Streptococcus pneumoniae* (lytA) byl použit kmen 702/14, sérotyp 3. Hodnota LLOD byla 59,2 kopií/µl, to odpovídá 236,8 kopií v reakci.

Stanovení dolního limitu detekce – CFU/ml
Neisseria meningitidis 58/14, sérotyp B – v pokusu č. 1 LLOD 1 CFU/ml, v pokusu č. 2 LLOD 1 CFU/ml.
Haemophilus influenzae 1/14, netypovatelný kmen – v pokusu č. 1 LLOD 40 CFU/ml, v pokusu č. 2 LLOD 30 CFU/ml.
Streptococcus pneumoniae 199/12, sérotyp 4 – v pokusu č. 1 LLOD 10 CFU/ml, v pokusu č. 2 LLOD 5 CFU/ml.

Stanovení přesnosti (opakovatelnosti, repeatability) v oblasti dolního limitu detekce (počet kopií DNA v objemové jednotce)
Neisseria meningitidis B, 323/97 – aritmetický průměr z 10 naměřených hodnot C_t – 38,184; variační koeficient 0,026.
Haemophilus influenzae NT, 1/14 – aritmetický průměr z 10 naměřených hodnot C_t – 37,418; variační koeficient 0,024.
Streptococcus pneumoniae 3, 702/14 – aritmetický průměr z 10 naměřených hodnot C_t – 38,872; variační koeficient 0,026.

Stanovení mezilehlé přesnosti (reprodukovatelnosti, reprodukcibility)
Neisseria meningitidis PA, 33/14 – 20 měření, variační koeficient 0,030.
Haemophilus influenzae NT, 1/14 – 20 měření, variační koeficient 0,037.
Streptococcus pneumoniae 6C, 105/14 – 20 měření, variační koeficient 0,041.

Charakteristiky rt-PCR testu odvozené od standardní křivky
• Detekce DNA *Neisseria meningitidis*, cílová sekvence sodC
Oblast linearity: Standardní křivka je lineární pro měření koncentrací DNA v rozsahu
1,21 . 102 – 1,21 . 10^6 kopií/µl.
Odvozené charakteristiky: směrnice přímky (slope) = -3,918; efektivita E = 80 %; korelační koeficient R^2 = 0,998
• Detekce DNA *Haemophilus influenzae*, cílová sekvence *hpd*
Oblast linearity: Standardní křivka je lineární pro měření koncentrací DNA v rozsahu
52,2–5,22 . 10^6 kopií/µl.
Odvozené charakteristiky: směrnice přímky (slope) = -4,046; efektivita E = 76,7 %; korelační koeficient R2 = 0,998
• Detekce DNA *Streptococcus pneumoniae*, cílová sekvence *lytA*
Oblast linearity: Standardní křivka je lineární pro měření koncentrací DNA v rozsahu
59,2–5,92 . 10^6 kopií/µl.
Odvozené charakteristiky: směrnice přímky (slope) = -3,834; efektivita E = 82,3 %; korelační koeficient R^2 = 0,991

Testování analytické specificity
Výsledky přehledně shrnuje tabulka 1.

Testování klinického materiálu
Výsledky přehledně shrnuje tabulka 1.

DISKUSE

Výsledky testování zvolené doporučené metody rt-PCR detekce DNA tří potenciálních původců invazivního bakteriálního onemocnění byly zhodnoceny z hlediska požadavků kladených na validaci tohoto typu molekulárně genetických metod a konečná podoba testu prováděného v rutinní praxi byla zvolena též s ohledem na patogenezi onemocnění.
Metoda byla zaváděna pro diagnostiku invazivního bakteriálního onemocnění a druhy vyšetřovaného materiálu byly zvoleny s přihlédnutím k evropským „case“ definicím invazivních meningokokových, hemofilových a pneumokokových onemocnění. Primárně se vyšetřuje sterilní klinický materiál, průkaz infekčního agens je proto bez ohledu na kvantitu jednoznačně podpůrnou informací pro diagnózu invazivního onemocnění. Byla proto zvolena metoda kvalitativní detekce bakteriální DNA, kde se předpokládá pro každou detekovanou sekvenci dvojí možný závěr vyšetření – pozitivní nebo ne-

proLékaře.cz | 11.11.2026

gativní nález DNA. Množství detekované DNA ve vzorku nekoreluje spolehlivě se závažností klinického stavu. Infekce více než jedním původcem je u invazivních bakteriálních onemocnění velmi vysoce nepravděpodobná a při testování nebyla tato možnost brána v úvahu.
Stanovení limitu detekce jako koncentrace CFU v objemové jednotce bylo provedeno pro ověření celého postupu včetně extrakce DNA.
Specificita testů pro jednotlivá detekovaná agens byla ověřena orientačně vyhledáním sekvencí jednotlivých oligonukleotidů ve vyhledávači NCBI (BLAST). Pro všechny oligonukleotidy byla potvrzena 100% shoda v sekvenci pouze v hledané oblasti genomu příslušných agens. Při testování specificity testu s použitím vzorků DNA izolované z jiných bakteriálních druhů byla pro *sod*C naměřena hodnota C_t pro 1 kmen *Neisseria gonorrhoeae* a 1 kmen *Neisseria lactamica*. V obou případech byly hodnoty C_t vyšší než arbitrárně stanovená hodnota cut-off, výsledek tedy může být hodnocen jako negativní. Pro druh *Neisseria meningitidis* byly při stanovení LLOD v počtu kopií DNA v objemové jednotce naměřeny pro nejnižší spolehlivě detekovanou koncentaci DNA 1,21 . 10^2 kopií/µl naměřeny hodnoty C_t v rozmezí 36,00–39,00. Oba zmíněné druhy jsou geneticky blízce příbuzné druhu *Neisseria meningitidis*, navíc mezi *N. lactamica* a *N. meningitidis*, blízce příbuznými druhy osidlujícími shodně sliznice horních dýchacích cest, dochází k horizontálnímu transferu genů [15]. Druh *Neisseria gonorrhoeae* je primárním patogenem a může být původcem invazivních onemocnění, *Neisseria lactamica* je součástí běžné orofaryngeální flóry a nepovažuje se za možného původce invazivního onemocnění v běžné populaci. U všech testovaných kmenů *Neisseria meningitidis* i klinických materiálů invazivních meningokokových onemocnění byla u *sod*C pozitivní reakce, což potvrdilo vhodnost výběru daného genu oproti genu *ctrA*, u něhož je popisována negativita až u 16 % kmenů *Neisseria meningitidis* [16]. Pro *hpd* byly hodnoty C_t naměřeny pouze pro kmeny náležející k druhu *Haemophilus influenzae*, což ukazuje na vysokou druhovou specificitu genu. Pro *lytA* byly hodnoty C_t naměřeny u 2 z 9 testovaných kmenů *Streptococcus mitis*. *Streptococcus mitis* je geneticky blízce příbuzný druhu *Streptococcus pneumoniae*, v jeho genomu může být přítomen funkční gen pro autolyzin. Whatmore et al. testovali různé cílové sekvence z oblasti genu pro autolyzin na velkém souboru kmenů patřících k druhům streptokoků ze skupiny „mitis group“, pro některé z testovaných kmenů byla zjištěna pozitivita i pro sekvenci používanou v implementovaném testu [17].
Pro testování metody na vzorcích klinického materiálu, kultivačně negativního, byly vybrány vzorky testované též seminested PCR metodou s elektroforetickou vizualizací produktů používanou původně v NRL MEN. Výsledky obou metod byly porovnány. Rozdílné výsledky byly pozorovány u 4 vzorků ze 55 vzorků testovaných. Jednalo se o dva vzorky séra a dva vzorky likvoru. U všech rozdílných případů byl výsledek seminested PCR pozitivní a rt-PCR negativní. Vzorky likvoru byly více než deset let skladovány v mrazu, což pravděpodobně ovlivnilo výsledky. Vzorky séra byly krátkodobě skladovány v mrazu a tato skutečnost mohla výsledky taktéž ovlivnit, avšak i podle jiných autorů je rt-PCR detekce DNA ve vzorcích séra méně spolehlivá. V našem souboru byl testován příliš malý počet vzorků séra k tomu, aby bylo možno vyvodit závěr, že nejde o materiál vhodný k testování. Kromě mozkomíšního moku byly testovány taktéž další druhy materiálu, byly však k dispozici ve velmi malém počtu vzorků. Tyto druhy materiálu budou k vyšetření přijímány, metoda však pro ně zatím nemohla být validována. Předchozí testování simulovaných vzorků nesrážlivé krve (data nejsou prezentována) ukázalo, že nesrážlivá krev je též vhodným materiálem pro testovanou metodu.
Použitím rt-PCR metodiky se podařilo velmi zkrátit časovou náročnost diagnostiky závažných invazivních bakteriálních meningokokových, hemofilových a pneumokokových onemocnění až na hranici pěti hodin. Dřívější diagnostika založená na metodě seminested PCR vyžadovala průměrně 9 hodin a kultivační vyšetření 24 hodin.

ZÁVĚR

Metoda rt-PCR detekce DNA *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae* byla prověřena testováním sbírkových bakteriálních kmenů i klinického kultivačně negativního materiálu v širokém rozsahu. Byly stanoveny validační parametry metody. Podle výsledů je metoda vhodná pro testování vzorků primárně sterilního klinického materiálu, především mozkomíšního moku a nesrážlivé krve. Implementovaná metoda je určena pro diagnostiku invazivních bakteriálních onemocnění. Molekulární metoda umožňuje detekci agens v kratším časovém intervalu a detekuje i nízkou koncentraci DNA ve vzorku (včetně kultivačně negativních, i několik dní po zahájení antibiotické terapie) a je doporučována k rutinnímu užívání. Provádění těchto molekulárních vyšetření má velký význam, vzhledem ke stále se zvyšujícímu procentu invazivních bakteriálních onemocnění kultivačně negativních, laboratorně diagnostikovaných pouze metodami PCR.

LITERATURA

1. Kalmusová J, Pavlíková V, Křížová P, et al. První výsledky PCR diagnostiky invazivního meningokokového onemocnění. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2001;7(1):15–19. ISSN 1211-264X.
2. Kalmusová J, Bronská E, Křížová P. Diagnostika invazivního meningokokového, hemofilového a pneumokokového onemocnění PCR metodou. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2004;10:130–133. ISSN 1211-264X.
3. Carvalho MG, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, Steigerwalt A, Whaley M, Facklam RR, Fields B, Carlone G, Ades EW, Dagan R, Sampson JS. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting lytA, ply, and psaA genes for detection of pneumococcal DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007; 45(8):2460–2466. ISSN 0095-1137.
4. Messmer TO, Sampson JS, Stinson A, Wong B, Carlone GM, Facklam RR. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2004;49:249–254. ISSN 0732-8893.
5. Mothershed EA, Sacchi CT, Whitney AM, Barnett GA, Ajello GW, Schmink S, Mayer LW, Phelan M, Taylor TH Jr, Bernhardt SA, Rosenstein NE, Popovic T. Use of real-time PCR to resolve slide agglu-

proLékaře.cz | 11.11.2026

tination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004;42(1): 320–328. ISSN 0095-1137.
6. Taha MK, Alonso JM, Cafferkey M, Caugant DA, Clarke SC, Diggle MA, Fox A, Frosch M, Gray SJ, Guiver M, Heuberger S, Kalmusova J, Kesanopoulos K, Klem AM, Kriz P, Marsh J, Mölling P, Murphy K, Olcén P, Sanou O, Tzanakaki G, Vogel U. Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genogrouping of Neisseria meningitidis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005;43(1):144–149. ISSN 0095-1137.
7. Wang X, Mair R, Hatcher C, Theodore MJ, Edmond K, Wu HM, Harcourt BH, Carvalho MG, Pimenta F, Nymadawa P, Altantsetseg D, Kirsch M, Satola SW, Cohn A, Messonnier NE, Mayer LW. Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitis surveillance with a new real-time PCR assay to detect Haemophilus influenzae. *International Journal of Medical Microbiology*, 2011;301:303–309. ISSN 1438-4221.
8. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. Simultaneous Detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in Suspected Cases of Meningitis and Septicemia Using Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001;39(4):1553–1558. ISSN 0095-1137.
9. WHO. PCR for Detection and Characterization of Bacterial Meningitis Pathogens: Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae, in Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO manual [online]. 2011, 2nd edition, Chapter 10. Dostupné na www: http://www.cdc.gov/meningitis/bacterial.html
10. CDC. Blood and Body Fluid DNA Extraction for Streptococci. CDC doporučení [online]. 2014, Dostupné na www: http://www.cdc.gov/streplab/downloads/pcr-body-fluid-DNA-extract-strep.pdf.
11. Emery SL, Erdman DD, Bowen MD, et al. Real-Time Reverse Transcriptiom-Polymerase Chain Reaction Assay for SARS-associated Coronavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 2004;10(2):311–316. ISSN 1080-6040.
12. Piet JR, Huis in 't Veld RAG, van Schaik BDC, et al. Genome Sequence of Neisseria meningitidis Serogroup B Strain H44/76. *Journal of Bacteriology,* 2011;193(9):2371–2372. ISSN 1098-5530.
13. Harrison A, Dyer DW, Gillaspy A, et al. Genomic Sequence of an Otitis Media Isolate of Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Comparative Study with *H. influenzae* Serotype d, Strain KW20. *Journal of Bacteriology*, 2005;187(13): 4627–4636. ISSN 1098-5530.
14. Hiller NL, Janto B, Hogg JS, et al. Comparative Genomic Analyses of Seventeen *Streptococcus pneumoniae* Strains: Insights into the Pneumococcal Supragenome. *Journal of Bacteriology*, 2007;189(22):8186–8195. ISSN 1098-5530.
15. Hanage WP, Fraser C, Spratt BG. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biology*, 2005;3:3–6. ISSN 1741-7007.
16. Dolan TJ, Hatcher CP, Satterfield DA, et al. sodC-Based Real-Time PCR for Detection of Neisseria meningitidis. *PLoS ONE*, 2011;6(5): e19361. ISSN 1932-6203.
17. Whatmore AW, Efstratiou A, Pickerill AP, et al. Genetic Relationships between Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: Characterization of "Atypical" Pneumococci and Organisms Allied to *S. mitis* Harboring *S. pneumoniae* Virulence Factor-Encoding Genes. *Infection and Immunity*, 2000;68(3):1374–1382. ISSN 1098-5522.

Podpořeno MZ ČR - RVO („Státní zdravotní ústav - SZU, 75010330").

Do redakce došlo dne 3. 11. 2014.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Zuzana Vacková
SZÚ Praha
Šrobárova 48
100 42 Praha 10
e-mail: zuzana.vackova@szu.cz

Inzerce A151005685 ▶