

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 093

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/689 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-458**
(22) Přihlášeno: **08.09.2018**
(40) Zveřejněno: **02.01.2020**
(Věstník č. 1/2020)
(47) Uděleno: **20.11.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **02.01.2020**
(Věstník č. 1/2020)

(56) Relevantní dokumenty:
KAJIHARA Y. et al.: „Preferential isolation of *Megasphaera elsdenii* from pig feces,“ *Anaerobe*, vol. 48, 2017, str. 160 - 164, ISSN 1075-9964;
ONIME L. et al.: „The use of quantitative real time polymerase chain reaction to quantify some rumen bacterial strains in an in vitro rumen system,“ *Italian Journal of Animal Science*, vol. 12:e58, no. 3, 2013, str. 366 - 370, ISSN 1594-4077; OUWERKERK D. et al.: „Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay,“ *Journal of Applied Microbiology*, vol. 92, no. 4, 2002, str. 753 - 758, ISSN 1364-5072.
CN 102154450.

(73) Majitel patentu:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ

(72) Původce:
doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D., Velešovice, CZ
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D., Velešovice, CZ
MVDr. Jitka Matiašovicová, Ph.D., Hostěnice, CZ
Mgr. Bc. Darina Čejková, Ph.D., Brno, Židenice, CZ
Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D., Janová, CZ
Mgr. Miroslava Kollarčíková, Kuřim, CZ
Ing. Daniela Karasová, Ph.D., Brno, Žabovřesky, CZ
Mgr. Magdaléna Crhánová, Ph.D., Brno, Stránice, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
Způsob detekce *Megasphaera elsdenii* pomocí metody PCR v reálném čase a sada primerů pro tento způsob detekce *M. elsdenii*

(57) Anotace:
Předkládané řešení poskytuje způsob specifické detekce bakterie *Megasphaera elsdenii* v obsahu trávicího traktu nebo trusu drůbeže, při němž se ze vzorku izoluje DNA, a následně se izolovaná DNA podrobí amplifikační reakci metodou real-time PCR s primery
Megasph_F3: ACGTCAACGAAGCCGAATAC
Megasph_R3: CGACGACCATGAACTGAATG.

Způsob detekce *Megasphaera elsdenii* pomocí metody PCR v reálném čase a sada primerů pro tento způsob detekce *M. elsdenii*

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález poskytuje způsob specifické detekce a kvantifikace *Megasphaera elsdenii* (*M. elsdenii*) v trusu nebo v obsahu tráveniny kuřat a slepic (drůbeže) pomocí metody PCR v reálném čase (real time PCR). Dále vynález poskytuje sadu primerů pro použití při tomto způsobu detekce *M. elsdenii*.

Dosavadní stav techniky

15 Střevní mikroflóra podstatným způsobem ovlivňuje a charakterizuje zdravotní stav hostitele. Stanovit skladbu střevní mikroflóry však není snadné, protože naprostá většina z asi tisíce různých bakteriálních druhů, které kolonizují trávicí trakt, jsou striktní anaerobové. Jejich kultivace se tedy musí provádět za anaerobních podmínek a vzhledem k jejich různorodosti pro mnoho z nich nejsou známy specifické kultivační podmínky. Přitom pod pojmem „specifické

20 kultivační podmínky“ je nutno chápat podmínky, které umožní růst cílové bakterie a současně potlačí růst všech ostatních bakterií. Kultivace vybraných bakterií trávicího traktu včetně *M. elsdenii* za účelem jejich specifické kvantifikace je proto v současnosti nemožná.

Problémy spojené se specifickou kultivací anaerobních bakterií z trávicího traktu se v poslední době řeší alternativními přístupy založenými na průkazu nukleových kyselin ve vzorcích. V posledních 10 letech se velmi rozšířilo stanovení skladby střevní mikroflóry pomocí nové generace sekvenování nukleových kyselin (next-generation sequencing), které je v případě sledování skladby bakteriálních populací velmi často spojené s předchozí PCR amplifikací části genu pro 16S rRNA. Tento nástroj však zůstává poměrně finančně nákladný a v jednom stanovení se obvykle analyzuje více vzorků. V laboratoři původců tohoto vynálezu se například zpracovává narázově vždy 160 vzorků, a tak určitou dobu trvá, než se nashromáždí vzorky k analýze. Proto jsou zapotřebí i operativnější metody, u kterých by nebylo potřeba čekat týdny na kumulaci mezi sebou nesouvisejících vzorků. Pro tyto potřeby se nabízí využití PCR přísně specifické pro cílovou bakterii. PCR průkaz, ve srovnání s využitím sekvenování nové generace,

35 má výhodu i v tom, že není ovlivněn počtem kopií genů pro 16S rRNA anebo velikostí genomů, což jsou faktory, které ovlivňují výstupy ze sekvenování. Přestože je tedy PCR přímočará volba, problémy vyvstávají v okamžiku návrhu specifických primerů. Typicky není známo, na jaké sekvence je vhodné primery navrhnout, které části genomu cílové bakterie jsou pro ni přísně specifické a které se naopak mohou vyskytovat i v necílových druzích. Při množství bakterií, které osídlují trávicí trakt (cca 1000 různých druhů u každého jedince) a počtu genů, které každá bakterie kóduje (obvykle 1500 až 5000 genů u každé bakterie v závislosti na konkrétním bakteriálním druhu), je nalezení cílových sekvencí a následně PCR primerů velmi náročné.

M. elsdenii je běžnou součástí střevní mikroflóry všech teplokrevných živočichů, tedy ptáků a savců, u kterých tvoří okolo 0,5 % z celkové mikroflóry. U kuřat v komerční produkci se v trávicím traktu objevuje od 10. týdne života (Videnska P, Sedlar K, Lukac M, Faldynova M, Gerzova L, Cejkova D, Sisak F, Rychlik I. Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole life. PLoS One 2014;9:e115142). *M. elsdenii* patří mezi významné producenty butyrátu (Polansky O, Sekelova Z, Faldynova M, Sebkova A, Sisak F, Rychlik I. Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota. Appl Environ Microbiol 2015;82:1569-76). Produkce butyrátu má přitom pozitivní vliv na funkci trávicího traktu, protože potlačuje virulenci patogenů, jako je např. *Salmonella* Enteritidis (Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JC, Van Immerseel F. Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. Appl Environ Microbiol 2006;72:946-9). Butyrát je

současně preferovaný zdroj energie epiteliálních buněk v trávicím traktu (Fleming SE, Fitch MD, DeVries S, Liu ML, Kight C. Nutrient utilization by cells isolated from rat jejunum, cecum and colon. J Nutr 1991;121:869-878) a posiluje integritu střevního epitelu (Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, Wilson KE, Glover LE, Kominsky DJ, Magnuson A, Weir TL, Ehrentraut SF, Pickel C, Kuhn KA, Lanis JM, Nguyen V, Taylor CT, Colgan SP. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. Cell Host Microbe. 2015;17:662-671). *M. elsdenii* navíc může účinně kolonizovat trávicí trakt drůbeže od prvních dnů života kuřat a lze o ní uvažovat jako o bakterii s probiotickým potenciálem (dosud nepublikované výsledky). Všechny tyto skutečnosti znamenají, že přítomnost *M. elsdenii* je pozitivním znakem zdravotního stavu a naopak úbytek nebo absence je indikátorem nežádoucího složení střevní mikroflóry a nesprávné funkce trávicího traktu.

Podmínky pro selektivní kultivaci *M. elsdenii* nejsou známy. *M. elsdenii* sice lze kultivovat na WCHA nebo YCFA agaroch za striktně anaerobních podmínek, avšak tyto agary podporují růst i mnoha dalších anaerobních bakterií. Po výsevu tráveniny nebo trusu na uvedené kultivační půdy pak narostou kolonie tvořené *M. elsdenii* současně se stovkami kolonií dalších necílových bakterií. Použití vzorku trusu jako výchozího materiálu dále zhoršuje pravděpodobnost kultivačního záchytu *M. elsdenii*, protože jakákoli expozice trusu velmi rychle vede k inaktivaci *M. elsdenii* vzdušným kyslíkem. Kultivační kvantifikace *M. elsdenii* proto není možná, a to i přesto, že tuto bakterii lze považovat za příznak dobrého zdravotního stavu a funkčního trávicího systému.

25 Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je způsob detekce bakterie *Megasphaera elsdenii* v obsahu trávicího traktu a trusu drůbeže, jehož podstata spočívá v tom, že se ze vzorku izoluje DNA, a následně se izolovaná DNA podrobí amplifikační reakci metodou PCR v reálném čase (real-time PCR) s primery

Megasph_F3: ACGTCAACGAAGCCGAATAC (SEQ ID NO. 1),
Megasph_R3: CGACGACCATGAACTGAATG (SEQ ID NO. 2).

35 Uvedené primery zajišťují amplifikaci PCR produktu, kterým je 135 bp dlouhá část genu pro glukarátový transportér (glucarate transporter). Tato sekvence je specifická pro *M. elsdenii* a nedochází ke křížovým reakcím s dalšími mikroorganismy přítomnými v kuřecím trusu či trávenině. Bylo experimentálně ověřeno, že uvedené primery jeví nejvyšší specifitu pro stanovení *M. elsdenii* z testovaných dvojic primerů.

40 Ve výhodném provedení se dále provede amplifikační reakce s primery 16S_F1: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO. 3) a 16S_R1: CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4) amplifikujícími část genu pro 16S rRNA všech eubakterií. Amplifikace eubakteriální DNA se využije při kvantifikaci *M. elsdenii*, kdy se vypočte poměr amplifikačního produktu specifického pro *M. elsdenii* vůči amplifikačnímu produktu pro všechny eubakterie.

50 Poměr amplifikačního produktu specifického pro *M. elsdenii* se vypočte s výhodou tak, že se nejprve odečte Ct hodnota amplifikace *M. elsdenii* (Megasph_F3 a R3) od Ct hodnoty amplifikace eubakteriální DNA (16S_F1 a R1) čímž se získá rozdíl mezi hodnotami Ct (ΔCt). Následně se na tento rozdíl umocní základ 2 ($2^{\Delta Ct}$), vypočte se převrácená hodnota ($1/2^{\Delta Ct}$) a výsledek se vynásobí číslem 100 ($100 \times 1/2^{\Delta Ct}$), čímž se získá podíl *M. elsdenii* v celé eubakteriální populaci v procentech.

55 Předmětem předkládaného vynálezu je dále sada primerů pro real time PCR obsahující primery Megasph_F3: ACGTCAACGAAGCCGAATAC (SEQ ID NO. 1), Megasph_R3:

CGACGACCATGAACTGAATG (SEQ ID NO. 2), které specificky detekují *M. elsdenii* ve vzorcích.

5 Ve výhodném provedení může sada primerů dále obsahovat primery 16S_F1: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO. 3) a 16S_R1: CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4) amplifikující část genu pro 16S rRNA u všech eubaktérií, tato sada je vhodná pro kvantitativní stanovení *M. elsdenii* ve vzorcích.

10 Před návrhem specifických primerů byly v laboratoři původců tohoto vynálezu postupně izolovány anaerobní bakterie z trávicího traktu drůbeže a u 327 z nich byly stanoveny kompletní sekvence genomu. U všech bakterií byly předpovězeny všechny geny, které kódují proteiny. Protože se v mnoha případech podařilo získat více než jednoho zástupce daného bakteriálního druhu, bylo možno porovnat, které geny se vyskytují u všech izolátů cílového druhu a současně zcela chybí u všech necílových druhů. V případě *M. elsdenii* jsme identifikovali 32 genů, které se
15 vyskytly pouze u obou izolátů *M. elsdenii*, které jsme sekvenovali, a naopak zcela chyběly u zbylých 325 bakterií. Z těchto genů byly vybrány tři geny k dalšímu testování. Při selekci tří genů bylo zohledněno, aby i) délka genů byla větší než 500 bp, ii) se cílové geny vyskytovaly na co nejdelších kontizích (contig) po sekvenování, iii) se cílové geny vyskytovaly uprostřed kontigů a ne na jejich koncích a iv) název genu snižoval pravděpodobnost jejich výskytu na mobilních genetických elementech (byly vyloučeny geny s názvy transposase, integrase, phage, conjugative apod), které se mohou vyskytovat v nejednoznačném počtu kopií na genom. Funkčnost navržených primerů byla ověřena na testovacích vzorcích a ze tří navržených dvojic primerů byla určena ta dvojice primerů, která na testovacích vzorcích opakovaně vykazovala nejnižší hodnoty Ct po analýze pomocí real time PCR. Funkčnost vybrané sady primerů byla následně ověřena na
20 reálných vzorcích trusu kuřat, u kterých bylo zastoupení *M. elsdenii* stanovené jak pomocí real time PCR s primery podle předkládaného vynálezu, tak i sekvenováním V3 a V4 variabilních oblastí genů pro 16S rRNA. Výstupy obou metod si odpovídají, což znamená, že stejně kvalitního výsledku lze dosáhnout náročnějším sekvenováním i jednodušší a praktičtější metodou real time PCR, použijí-li se pro real time PCR primery podle tohoto vynálezu.

30

Objasnění výkresů

35 Obr. 1. Bodový korelační graf pro porovnání detekce *M. elsdenii* pomocí real time PCR a sekvenováním genů pro 16S rRNA. Vybrané vzorky byly analyzovány oběma postupy a výsledky (vypočtené procentuální zastoupení stanovené každou metodou) jsou vyneseny na osách X a Y.

40 Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Návrh primerů pro specifickou detekci *M. elsdenii*

45 Cílový gen pro glukarátový transportér (glucarate transporter) se vyskytoval u obou izolátů *M. elsdenii*, u kterých byla stanovena kompletní sekvence jejich genomu. Tento gen se však nevyskytoval u žádné další bakterie. V cílovém genu byla i mezi porovnanými izoláty pozorována určitá variabilita, a proto byly primery navrženy do oblastí, která byla u obou izolátů identická. Níže jsou zde uvedeny části z celé sekvence genu pro glukarátový transportér pro oba izoláty, a to části, která je rozhodující pro návrh primerů. Oblasti odpovídající primerům podle
50 vynálezu jsou podtrženy (forward primer – jednoduché podtržení, reverse primer – dvojité podtržení).

Izolát An286 (SEQ ID NO. 5)

```

CCCCTCGTCGGCCCGGCCATTACGGTCGCCCTCATGGCCGCCATGGGCTGGCATGCCGTA      540
TTCATCATCTTCGGCCTCGTCGGCATCGTCCTGGCTGGGTATGGCACAAATACGCCAC          600
GATAACCCGGCTCACAGCCCCTACGTCAACGAAGCCGAATACGCTCATATCACCGAAGGC        660
CGCGCCGCTGCCAGTAAAAGAAAAGCGTCGCCCCGTGGAGCAAATTCCTCCGCTCGTCC        720
CAGTTCTGGGCCGTCGGCATTCAGTTCATGGTTCGTCGACTACATCATGTACGTCTTCCTG      780
GCCTGGCTGCCCTGTACCTGACGGAAGTGCACAACCTGTCCCTGAAAGCTATGGGCATC      840
TGGGCTTCCTTCCCGTGGATCGCCCTCATGGCCATGGTCTTCGTCGCCGGTTATATTTCC      900

```

Izolát An771 (SEQ ID NO. 6)

```

CCCCTCGTCGGCCCGGCCATTACGGTCGCCCTCATGGCCGCCATGGGCTGGCATGCCGTA      540
TTCATCATCTTCGGCCTCGTCGGCATCGTCCTGGCTGGGTATGGCACAAATACGCCAC          600
GATAACCCGGCTCACAGCCCCTACGTCAACGAAGCCGAATACGCTCATATCACCGAAGGC        660
CGCGCCGCTGCCAGTAAAAGAAAAGCGTCGCCCCGTGGAGCAAATTCCTCCGCTCGTCC        720
CAGTTCTGGGCCGTCGGCATTCAGTTCATGGTTCGTCGACTACATCATGTACGTCTTCCTG      780
GCCTGGCTGCCCTGTACCTGACGGAAGTGCACAACCTGTCCCTGAAAGCTATGGGCGTC      840
TGGGCTTCCTTCCCGTGGATCGCCCTCATGGCCATGGTCTTCGTCGCCGGCTATATTTCT      900

```

5

Příklad 2:

V následujícím příkladu byla izolována DNA z trusu kuřat pomocí QIAmp DNA Stool kitu (Qiagen, Německo). Získaná DNA byla využita jako templát v PCR se třemi různými dvojicemi primerů pro průkaz a kvantifikaci *M. elsdenii*. Výsledky získané z PCR jsou shrnuty v následující Tabulce 1.

10

Tabulka 1 Naměřené hodnoty Ct u zkoumaných vzorků

Vzorek	16S rRNA	Megasph1	Megasph2	Megasph3
čistá kultura 1	11,56	17,50	17,47	17,48
čistá kultura 2	12,08	17,35	16,75	17,05
kuře 1	12,06	17,0	16,1	16,5
kuře 2	11,60	ND	ND	ND
kuře 3	11,67	27,98	ND	ND
kuře 4	11,99	ND	ND	32,66
kuře 5	16,62	ND	ND	ND
kuře 6	17,3	ND	ND	32,78
kuře 7	17,59	30,07	29,19	29,69
průměrné Ct	13,60889	17,29	16,78	17,01

15

Legenda k tabulce:

16S rRNA – cílové byly geny pro eubakteriální 16S rRNA, použité primery 16S_F1, 16S_R1.

Megasph1 – cílový gen byl hemin ABC transportér, permeáza (hemin ABC transporter, permease protein), použity byly primery cílené na tento gen

20 Megasph2 - cílový gen byl methionin gama-lyáza (methionine γ -lyasa), použity byly primery cílené na tento gen

Megasph3 - cílový gen byl glukarátový transportér (glucarate transporter), použité primery: Megasph_F3, Megasph_R3.

ND - nedetekováno

25

Ze tří testovaných dvojic primerů byla nejnižší hodnota Ct dosahována u primerů amplifikující část genu pro methionin gama-lyázu (methionine γ -lyase). U genu pro glutarátový transportér byla Ct hodnota o 0,2 cykly vyšší než při amplifikaci části genu pro methionin gama-lyázu.

V mezidobí však byl izolován a sekvenován další nezávislý izolát *M. elsdenii* An771. Porovnáním sekvencí primerů a celogenomových sekvencí *M. elsdenii* An286 a An771 bylo zjištěno, že dostupné kmeny se odlišují v sekvencích genu pro methionin gama-lyázu v místě návrhu reverse primeru. Naopak, sekvence genů pro glukarátový transportér v místě návrhu forward i reverse primerů byly u obou kmenů identické. Proto byly jako *M. elsdenii* specifické primery identifikovány primery cílené na gen pro glukarátový transportér.

Experimentální schéma

Byla izolována DNA z trusu kuřat pomocí QIAmp DNA Stool kitu (Qiagen, Německo). Získaná DNA byla využita jako templát v PCR pro průkaz a kvantifikaci *M. elsdenii* a současně jako templát pro stanovení skladby mikroflóry pomocí sekvenování genů pro 16S rRNA. Skladba mikroflóry v testovaných vzorcích byla stanovena sekvenováním části genů pro 16S rRNA jak jsme popsali dříve (Videnska et al. PLoS One 2014;9:e115142). Ze sekvenačních dat jsme pro následné porovnání využili jen údaje pro *M. elsdenii*.

Real time PCR ve formátu „SybrGreen“ byla provedena s využitím SybrGreen Master Mix (Qiagen, Německo). Amplifikační podmínky se sestávaly z 35 cyklů s následnou denaturační analýzou pro potvrzení identity vzniklého amplifikačního produktu. Každý cyklus se sestával z 30 s inkubace při 55 °C, 30 s inkubace při 72 °C a 30 s inkubace při 94 °C. Po každém cyklu se stanovila fluorescence ve vzorku a překročení prahové hodnoty fluorescence po určitém cyklu bylo vyjádřeno hodnotou Ct (threshold cycle). Na PCR bezprostředně navazovala denaturační analýza, při které se vzniklé amplifikační produkty vytemperovaly na 45 °C a v jednotlivých intervalech se postupně zahřívaly až na 95 °C. Při určité teplotě (teplota T_m, temperature of melting) došlo k rozpadu dvoušroubovicových molekul PCR produktů na jednovláknité molekuly DNA, který byl spojen s uvolněním barvičky SybrGreen z DNA a poklesem fluorescence. Protože teplota rozpadu dvoušroubovice na jednořetězcová vlákna je ovlivněna sekvencí, z teploty T_m lze usuzovat na identitu vzniklého PCR produktu. Real time PCR byla prováděna s primery specifickými pro *M. elsdenii* (Megasph_F3, Megasph_R3) a současně s primery 16S_F1 TCCTACGGGAGGCAGCAG a 16S_R1 CGTATTACCGCGGCTGCT amplifikujícími část genu pro 16S rRNA všech eubaktérií. Amplifikace eubakteriální DNA byla využita pouze pro kvantifikaci *M. elsdenii*.

Výsledky

Ze tří testovaných dvojic primerů amplifikujících části tří zcela odlišných genů byly jako *M. elsdenii* specifické primery vyhodnoceny primery vedoucí k amplifikaci části genu pro glukarátový transportér. Tato dvojice primerů je považována za nejvhodnější pro průkaz a kvantifikaci *M. elsdenii*. Teplota tání T_m výsledného PCR produktu byla 84,77 °C. Následně jsme kvantifikovali *M. elsdenii* pomocí real time PCR a současně i sekvenováním V3/V4 části genu pro 16S rRNA v reálných vzorcích. Porovnání zastoupení *M. elsdenii* v testovaných vzorcích stanovené oběma metodami jsme provedli výpočtem korelačních a regresních koeficientů. Korelační koeficient 0,818 i regresní hodnota spolehlivosti R² = 0,6539 (viz Obr. 1) shodně potvrdily značnou shodu ve výstupu obou postupů, a tedy relevanci detekce a kvantifikace *M. elsdenii* pomocí real time PCR. Navržená real time PCR definovaná sekvencemi primerů je tedy specifická a vhodná pro kvantifikaci *M. elsdenii* v reálných vzorcích trusu nebo obsahu trávicího traktu drůbeže.

Seznam sekvencí

- <110> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
- <120> Způsob a sada pro detekci *Megasphaera elsdenii*
- <130> P3

<160> 6
 <170> PatentIn version 3.5
 5 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> forward primer
 <400> 1
 15 acgtcaacga agccgaatac 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> reverse primer
 25 <400> 2
 cgacgacat gaactgaatg 20
 <210> 3
 <211> 18
 30 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> forward primer
 35 <400> 3
 tcctacggga ggcagcag 18
 <210> 4
 40 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 45 <223> reverse primer
 <400> 4
 cgtattaccg cggetgct 18
 50 <210> 5
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Megasphaera elsdenii
 55 <400> 5

cccgtcgtcg gcccgccat tacggcgcc ctcatggccg ccatgggctg gcatgccgta 60
 ttcatcatct tggcctcgt eggcacgctc ctggcctggg tatggcacia atacgcccac 120
 gataaccgg ctcacagccc ctacgtcaac gaagccgaat acgctcatat caccgaagge 180
 cgcgcccgtg ccagtgaana gaaaagcgtc gccccgtgga gaaaattcct ccgctcgtcc 240
 5 cagttctggg ccgtcggcat tcagttcatg gtcgtcgact acatcatgta cgtcttctg 300
 gcctggctgc ccctgtacct gacggaagtg cacaacctgt ccctgaaagc tatgggcatc 360
 tgggcttct tcccgtggat gcacctcatg gccatggtct tcgtgccgg ttatattcc 420

<210> 6
 10 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *Megasphaera elsdenii*

<400> 6
 15 cccgtcgtcg gcccgccat tacggcgcc ctcatggccg ccatgggctg gcatgccgta 60
 ttcatcatct tggcctcgt eggcacgctc ctggcctggg tatggcacia atacgcccac 120
 gataaccgg ctcacagccc ctacgtcaac gaagccgaat acgctcatat caccgaagge 180
 cgcgcccgtg ccagtgaana gaaaagcgtc gccccgtgga gaaaattcct ccgctcgtcc 240
 cagttctggg ccgtcggcat tcagttcatg gtcgtcgact acatcatgta cgtcttctg 300
 20 gcctggctgc ccctgtacct gacggaagtg cacaacctgt ccctgaaagc tatgggctgc 360
 tgggcttct tcccgtggat gcacctcatg gccatggtct tcgtgccgg ctatattct 420

25 PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob detekce bakterie *Megasphaera elsdenii* v obsahu trávicího traktu nebo trusu drůbeže,
 30 **vyznačený tím**, že se ze vzorku izoluje DNA, a následně se izolovaná DNA podrobí amplifikační
 reakci s primery

Megasph_F3: ACGTCAACGAAGCCGAATAC (SEQ ID NO. 1),
 Megasph_R3: CGACGACCATGAACTGAATG (SEQ ID NO. 2)

35 metodou PCR v reálném čase.

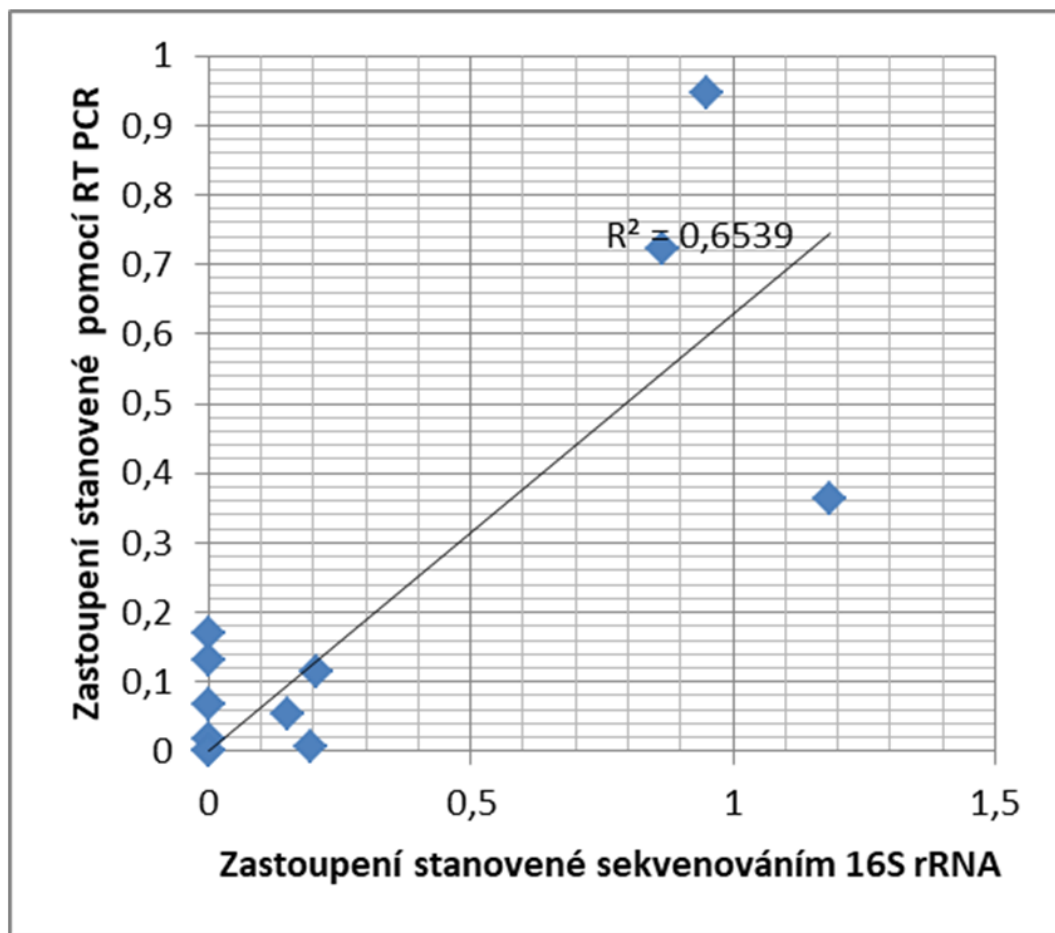
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím**, že se dále provede amplifikační reakce izolované
 DNA metodou PCR v reálném čase s primery 16S_F1: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID
 NO. 3) a 16S_R1: CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4) amplifikujícími část genu pro
 40 16S rRNA všech eubaktérií a vypočte se podíl *Megasphaera elsdenii* na celkovém počtu
 eubaktérií.

3. Způsob podle nároku 2, **vyznačený tím**, že se podíl *Megasphaera elsdenii* na celkovém
 počtu eubaktérií vypočte tak, že se nejprve odečte Ct hodnota *Megasphaera elsdenii* od Ct
 45 hodnoty amplifikace eubakteriální DNA (ΔC_t), následně se na tento rozdíl umocní základ 2
 ($2^{\Delta C_t}$), vypočte se převrácená hodnota ($1/2^{\Delta C_t}$) a výsledek se vynásobí číslem 100 ($100 \times 1/2^{\Delta C_t}$),
 čímž se získá podíl *Megasphaera elsdenii* v celé eubakteriální populaci v procentech.

4. Sada primerů pro detekci bakterie *Megasphaera elsdenii* ve vzorcích metodou PCR
 50 v reálném čase, **vyznačující se tím**, že obsahuje primery Megasph_F3:
 ACGTCAACGAAGCCGAATAC (SEQ ID NO. 1), Megasph_R3:
 CGACGACCATGAACTGAATG (SEQ ID NO. 2).

5. Sada podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje primery 16S_F1: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO. 3) a 16S_R1: CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4).

1 výkres



Obr. 1