

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 099

(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: **2018-457**
(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:

LEE Y. et al.: „Clinical *Fusobacterium mortiferum* isolates cluster with undifferentiated *Clostridium rectum* species based on 16S rRNA gene phylogenetic analysis,“ *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 46, no. 3, 2016, str. 279 - 281, ISSN 0091-7370; DE WITTE C. et al.: „Detection, isolation and characterization of *Fusobacterium gastroisuis* sp. nov. colonizing the stomach of pigs,“ *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 40, no. 1, 2017, str. 42 - 50, ISSN 0723-2020; NAGANO Y. et al.: „Development of a genus-specific PCR assay for the molecular detection, confirmation and identification of *Fusobacterium* spp.,“ *British Journal of Biomedical Science*, vol. 64, no. 2, 2007, str. 74 - 77, ISSN 0967-4845.

(73) Majitel patentů:

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 *Fusobacterium mortiferum* pomocí metody PCR v reálném čase a sada primerů pro tento způsob detekce *F. mortiferum*

(57) Anotace:

Předkládané řešení poskytuje způsob specifické detekce bakterie *Fusobacterium mortiferum* 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
FusoF3: CCCACCAGCTATGCTAAGTGAG
FusoR3: TGCCGTAGTGATAGCAGAGAGG.

Způsob detekce *Fusobacterium mortiferum* pomocí metody PCR v reálném čase a sada primerů pro tento způsob detekce *F. mortiferum*

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález poskytuje způsob specifické detekce a kvantifikace *Fusobacterium mortiferum* (*F. mortiferum*) 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 *F. mortiferum*.

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

25 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, 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 osídľují 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.

45 *F. mortiferum* nepatří mezi běžnou součást střevní mikroflóry kuřat. Prohledávání databáze PubMed v srpnu 2018 s klíčovými hesly *Fusobacterium* AND *mortiferum* AND chicken nevedlo k jedinému záznamu. Přesto zejména u nosných typů drůbeže na konci snůšky původci tohoto vynálezu v době poklesu produkce vajec často pozorovali nárůst *F. mortiferum* ve střevní mikroflóře. Není známo, zda nárůst *F. mortiferum* představuje vlastní příčinu poklesu snůšky, nebo se jedná o důsledek jiných jevů, které současně vedou k poklesu snůšky i nárůstu *F. mortiferum*. Absence této znalosti však nebrání využití zastoupení *F. mortiferum* ve střevní mikroflóře jako negativního znaku zdravotního stavu drůbeže.

Podmínky pro selektivní kultivaci *F. mortiferum* nejsou známy. *F. mortiferum* 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 *F. mortiferum* současně se stovkami kolonií dalších necílových bakterií. Použití vzorku trusu jako výchozího materiálu dále zhoršuje pravděpodobnost kultivačního záchytu *F. mortiferum*, protože jakákoli expozice trusu velmi rychle vede k inaktivaci *F. mortiferum* vzdušným kyslíkem. Kultivační kvantifikace *F. mortiferum* proto není možná, přestože lze zvýšený výskyt této bakterie využít jako negativní znak zdravotního stavu drůbeže.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je způsob detekce bakterie *Fusobacterium mortiferum* 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 real-time PCR s primery

FusoF3: CCCACCAGCTATGCTAAGTGAG (SEQ ID NO. 1),
FusoR3: TGCCGTAGTGATAGCAGAGAGG (SEQ ID NO. 2).

Uvedené primery zajišťují amplifikaci PCR produktu, kterým je 184 bp dlouhá část genu pro protein přenášejí melibiosu (melibiose carrier protein). Tato sekvence je specifická pro *F. mortiferum* a nedochází ke křížovým reakcím s dalšími mikroorganismy přítomnými v trusu či trávenině kuřat a slepic. Bylo experimentálně ověřeno, že uvedené primery jeví nejvyšší specifitu pro stanovení *F. mortiferum* z testovaných dvojic primerů.

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

Poměr amplifikačního produktu specifického pro *F. mortiferum* se vypočte s výhodou tak, že se nejprve odečte Ct hodnota amplifikace *F. mortiferum* (FusoF3 a R3) od Ct hodnoty amplifikace eubakteriální DNA (16S_F 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 *F. mortiferum* v celé eubakteriální populaci v procentech.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále sada primerů pro real time PCR obsahující primery FusoF3: CCCACCAGCTATGCTAAGTGAG (SEQ ID NO. 1), FusoR3: TGCCGTAGTGATAGCAGAGAGG (SEQ ID NO. 2), které specificky detekují *F. mortiferum* ve vzorcích.

Ve výhodném provedení může sada primerů dále obsahovat primery 16S_F: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO. 3) a 16S_R: CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4) amplifikující část genu pro 16S rRNA u všech eubakterií, tato sada je vhodná pro kvantitativní stanovení *F. mortiferum* ve vzorcích.

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 *F. mortiferum* bylo identifikováno 124 genů, které se vyskytly pouze u obou izolátů *F. mortiferum*, které byly sekvenovány, a naopak zcela chyběly u zbylých 325 bakterií. Z těchto genů byly vybrány tři geny k dalšímu testování. Při

selekcí tří genů bylo zohledněno, aby i) délka cílových 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. S využitím sekvencí těchto genů byly navrženy primery pro real time PCR do míst, ve kterých byly sekvence cílových genů u obou nezávislých izolátů *F. mortiferum* zcela identické. Funkčnost navržených primerů byla ověřena na testovacích vzorcích. 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 reálných vzorcích trusu kuřat, u kterých bylo zastoupení *F. mortiferum* stanoveno 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.

Objasnění výkresů

Obr. 1. Bodový korelační graf pro porovnání detekce *Fusobacterium mortiferum* 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.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Návrh primerů pro specifickou detekci *F. mortiferum*.

Cílový gen pro protein přenášející melibiosu (melibiose carrier protein) se vyskytoval u obou izolátů *F. mortiferum*, 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 oblasti, která byla u obou izolátů identická.

Níže jsou zde uvedeny části z celé sekvence genu pro protein přenášející melibiosu pro oba izoláty, a to části, která je rozhodující pro návrh primerů. Oblasti odpovídající primerům podle vynálezu jsou podtrženy (forward primer – jednoduché podtržení, reverse primer – dvojité podtržení).

```

Izolát An397 (SEQ ID NO. 5)
AAAATTATGTTAGCTTGTCTAGCTTTATTAATAGTTTTTACACTTTGTCCTTTCCAACTT      960
GGAAGAGCTATTCCTGTATCTATGGGATATCCTCTTTTTGCTTTAATAGGTATTCAGTA      1020
GCTGGTTCAGCTTTTATCTTCCCACCAGCTATGCTAAGTGAGATAGGTAGTAAAATTAGT      1080
GAAGAGAATGGAATAGAAATAGAGGGAGTTTGGCTTTGGAATTC AAGGCTTTTTCTTAAAG      1140
ATGGCTTTTATGATATCTATACTTATTTTACCAATCATACTGGTTGCTGGTAATGGAGAT      1200
ATCCTCTCTGCTATCACTACGGCACCTAAAGGAGTAGAAAAATCTGGTATATATCTAACT      1260
GCTCTTATATCAGCTCTCTCTTTTATGATATCATTTTTCTTTTATTATAGATATGAAGAG      1320

```

Izolát An425 (SEQ ID NO. 6)

```

AAAATTATGTTAGCTTGTCTAGCTTTATTAATAGTTTTTACACTTTGTCTTTTCCAACCTT      960
GGAAGAGCTATTTCCTGTATCTATGGGATATCCTCTTTTTGCTTTAATAGGTATCCAGTA      1020
GCTGGTTTCAGCTTTTATCTTTCCCACCAGCTATGCTAAGTGAGATAGGTAGTAAAAATTAGT      1080
GAAGAGAATGGAAATAGAATAGAGGGAGTTTTGCTTTGGAATTC AAGGCTTTTTCTTAAAG      1140
ATGGCTTTTATGATATCTATACTTATTTTACCAATCATACTGGTTGCTGTAATGGAGAT      1200
ATCCTCTCTGCTATCACTACGGCACCTAAAGGAGTAGAAAAATCTGGTATATATCTAACT      1260
GCTCTTATATCAGCTCTCTCTTTTATGATATCATTTTTCTTTTATTATAGATATGAAGAG      1320

```

Příklad 2:

- 5 V následujícím příkladu byla izolována DNA z trusu kuřat a slepic pomocí QIAmp DNA Stool kitu (Qiagen, Německo). Získaná DNA byla využita jako templát v PCR se třemi různými dvojicemi primerů pro průkaz a kvantifikaci *F. mortiferum*. Výsledky získané z PCR jsou shrnuty v následující Tabulce 1.
- 10 Tabulka 1 Naměřené hodnoty Ct u zkoumaných vzorků

vzorek (věk, d=den/t=týden)	16S rRNA	Fuso1	Fuso2	Fuso3
kuře 7d	8,91	ND	ND	ND
kuře 7d	9,25	34,96	40,0	ND
kuře 7d	8,2	ND	35,9	ND
kuře 7d	11,1	ND	35,2	40,0
kuře 15d	9,7	ND	ND	ND
kuře 21d	10,1	ND	36,1	ND
kuře 29d	9,5	ND	37,4	ND
kuře 35d	9,10	ND	38,05	ND
kuře 35d	9,13	ND	39,0	ND
kuře 35d	7,97	ND	ND	ND
kuře 35d	8,17	40,0	ND	ND
slepice 31t	7,1	ND	17,9	16,7
slepice 45t	6,6	ND	22,8	21,9
slepice 45t	8,9	ND	30,4	30,9
slepice 53t	6,0	19,87	17,6	17,03
slepice 53t	6,97	20,6	18,5	17,83
průměrné Ct	8,54	20,23	20,45	19,76

Legenda k tabulce:

- 16S rRNA – cílové byly geny pro eubakteriální 16S rRNA, použité primery: 16S_F a 16S_R
- 15 Fusol – cílový gen byl 2-fosfosulfolaktát fosfatáza (2-phosphosulfolactate phosphatase), použity byly primery navržené pro tento gen
- Fuso2 – cílový gen byl vnější membránový receptor systému transportu heminu (haemin uptake system outer membrane receptor), použity byly primery navržené pro tento gen
- Fuso3 – cílový gen byl protein přenášející melibiosu (melibiose carrier protein), použité primery:
- 20 Fusof3 a Fusor3.
- ND – nedetekováno

- 25 Ze tří testovaných dvojic primerů byla nejnižší hodnota Ct opakovaně dosahována u primerů amplifikujících část genu pro protein přenášející melibiosu. Proto byly jako *F. mortiferum* specifické vyhodnoceny primery cílené na gen pro protein přenášející melibiosu.

Experimentální schéma

- DNA byla izolována z trusu kuřat a slepic pomocí QIAmp DNA Stool kitu (Qiagen, Německo). Získaná DNA byla využita jako templát v PCR pro průkaz a kvantifikaci *F. mortiferum* 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 *F. mortiferum*.
- 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 jednovteřinových 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 *F. mortiferum* (FusoF3 a FusoR3) a současně s primery 16S_F TCCTACGGGAGGCAGCAG a 16S_R CGTATTACCGCGGCTGCT amplifikujícími část genu pro 16S rRNA všech eubakterií. Amplifikace eubakteriální DNA byla využita pouze pro kvantifikaci *F. mortiferum*.

Výsledky

- Ze tří testovaných dvojic primerů amplifikujících části tří zcela odlišných genů byla nejnižší hodnota Ct opakovaně dosahována u primerů amplifikujících část genu pro protein přenášející melibiosu. Tato dvojice primerů proto byla ověřena jako nejvhodnější pro průkaz a kvantifikaci *F. mortiferum*. Teplota tání T_m výsledného PCR produktu byla 75,60 °C. Následně jsme kvantifikovali *F. mortiferum* pomocí real time PCR a současně i sekvenováním V3/V4 části genu pro 16S rRNA v reálných vzorcích. Porovnání zastoupení *F. mortiferum* v testovaných vzorcích stanovené oběma metodami jsme provedli výpočtem korelačních a regresních koeficientů. Korelační koeficient 0,950 i regresní hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,9028$ (viz Obr. 1) shodně potvrdily značnou shodu ve výstupu obou postupů, a tedy relevanci detekce a kvantifikace *F. mortiferum* pomocí real time PCR. Navržená real time PCR definovaná sekvencemi primerů je tedy specifická a vhodná pro kvantifikaci *F. mortiferum* 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 *Fusobacterium mortiferum*
 <130> P2
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> forward primer
 <400> 1
 cccaccagct atgctaagtg ag 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> reverse primer
 <400> 2
 tgccgtagtg atagcagaga gg 22
 <210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> forward primer
 <400> 3
 tcctacggga ggcagcag 18
 <210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> reverse primer
 <400> 4
 cgtattaccg cggctgct 18
 <210> 5
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *Fusobacterium mortiferum*
 <400> 5
 aaaattatgt tagcttgct agctttatta atagttttta cactttgtct tttccaactt 60

ggaagagcta ttctgtatc tatgggatat cctctttttg ctttaatagg tattccagta 120
gctggttcag cttttatctt cccaccagct atgctaagtg agataggtag taaaattagt 180
gaagagaatg gaaatagaat agagggagtt tgctttggaa ttcaaggctt tttcttaaag 240
atggctttta tgatatctat acttatttta ccaatcatac tggttgctgg taatggagat 300
atcctctctg ctatcactac ggcacctaaa ggagtagaaa aatctggtat atatctaact 360
gctcttatat cagctctctc ttttatgata tcatttttct tttattatag atatgaagag 420

<210> 6
<211> 420
<212> DNA
<213> *Fusobacterium mortiferum*

<400> 6
aaaattatgt tagcttgtct agctttatta atagttttta cactttgtct tttccaactt 60
ggaagagcta ttctgtatc tatgggatat cctctttttg ctttaatagg tattccagta 120
gctggttcag cttttatctt cccaccagct atgctaagtg agataggtag taaaattagt 180
gaagagaatg gaaatagaat agagggagtt tgctttggaa ttcaaggctt tttcttaaag 240
atggctttta tgatatctat acttatttta ccaatcatac tggttgctgg taatggagat 300
atcctctctg ctatcactac ggcacctaaa ggagtagaaa aatctggtat atatctaact 360
gctcttatat cagctctctc ttttatgata tcatttttct tttattatag atatgaagag 420

5

PATENTOVÉ NÁROKY

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

FusoF3: CCCACCAGCTATGCTAAGTGAG (SEQ ID NO. 1),
FusoR3: TGCCGTAGTGATAGCAGAGAGG (SEQ ID NO. 2)

15

metodou PCR v reálném čase.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím**, že se dále provede amplifikační reakce metodou
real time PCR s primery 16S_F: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO. 3) a 16S_R:
CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4) amplifikujícími část genu pro 16S rRNA všech
eubaktérií a vypočte se podíl *Fusobacterium mortiferum* na celkovém počtu eubaktérií.

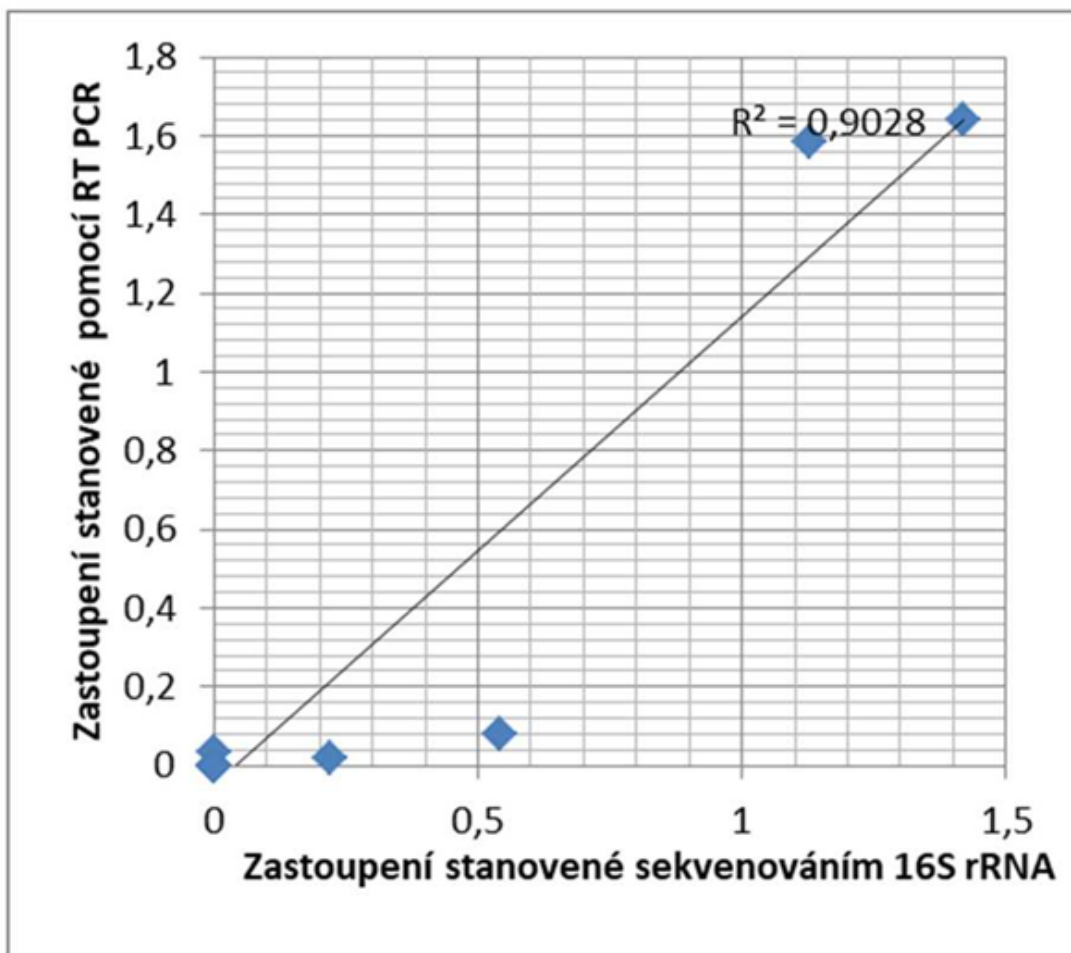
3. Způsob podle nároku 2, **vyznačený tím**, že se podíl *Fusobacterium mortiferum* na celkovém
počtu eubaktérií vypočte tak, že se nejprve odečte Ct hodnota amplifikace *Fusobacterium*
mortiferum od Ct hodnoty amplifikace eubakteriální DNA (ΔCt), následně se na tento rozdíl
umocní základ 2 ($2^{\Delta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

4. Sada primerů pro detekci bakterie *Fusobacterium mortiferum* v obsahu trávicího traktu nebo v trusu drůbeže metodou PCR v reálném čase, **vyznačující se tím**, že obsahuje primery FusoF3: CCCACCAGCTATGCTAAGTGAG (SEQ ID NO. 1) a FusoR3: TGCCGTAGTGATAGCAGAGAGG (SEQ ID NO. 2).

5

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

1 výkres



Obr. 1