

Genotypizace izolátů *Escherichia coli* z potravin

Bc. Martin Ovečka

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martin OVEČKA**
Osobní číslo: **T11126**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Genotypizace izolátů Escherichia coli z potravin**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Vypracujte aktuální literární rešerši o možnostech genotypizace kmenů *Escherichia coli* (fylogenetické skupiny, faktory virulence, bakteriociny).

II. Praktická část

1. Provedte PCR pro zjištění vybraných genotypových vlastností (fylogenetická skupina, přítomnost genů pro faktory virulence – *cnf1*, *cnf2*, *STII*, *VT1*, *VT2*, *iucD*, *neuC*, *vat* a dalších, přítomnost genů pro koliciny a mikrocin) u souboru kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] GORDON, David M., Olivier CLERMONT, Heather TOLLEY a Erick DENAMUR. Assigning Escherichia coli strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. Environmental Microbiology. 2008, roč. 10, č. 10, s. 2484–2496. ISSN 14622912. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x>.
- [2] ŠMARDA, Jan. Metody molekulární biologie. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [3] CLERMONT, Olivier, BONACORSI, Stéphan, BINGEN, Edouard. Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. Applied and Environmental Microbiology. 2000, roč. 66, č. 10, s. 4555–4558. DOI: 10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.
- [4] ŠMAJS, David, Lenka MICENKOVÁ, Jan ŠMARDA, Martin VRBA, Alena ŠEVČÍKOVÁ, Zuzana VALIŠOVÁ a Vladana WOZNICOVÁ. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal Escherichia coli: colicin E1 is a potential virulence factor. BMC Microbiology. 2010, roč. 10, č. 1, s. 288–. ISSN 1471-2180. DOI: 10.1186/1471-2180-10-288. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/288>.
- [5] RILEY, Margaret A. a John E. WERTZ. BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application. Annual Review of Microbiology. 2002, roč. 56, č. 1, s. 117–137. ISSN 0066-4227. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

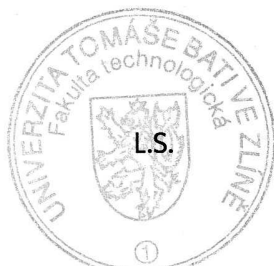
16. ledna 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2013

Ve Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 25.4.2013


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Escherichia coli je přirozenou součástí střevní mikroflóry teplokrevných živočichů, včetně člověka. Člověku je prospěšná nejenom produkcí látek působící antimikrobně vůči patogenním bakteriím, ale i účastí na tvorbě určitých vitamínů. Některé kmeny *E. coli* jsou ovšem patogenní a mohou způsobovat řadu intestinálních či extraintestinálních onemocnění. Cílem praktické části bylo provést u izolátů *E. coli* z potravin rozřazení do fylogenetických skupin (A, B1, B2, D), detekovat faktory virulence *iss*, *papC*, *neuC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, u vybraných kmenů *E. coli* dále *VT1*, *VT2*, *CNF1*, *CNF2*, *ST1*, *ST2*, *LT1*, *eaeA*, *Einv* a *Eagg* a u kolicinogenních kmenů detekovat typ bakteriocinu (24 kolicinů a 8 mikrocinů), to vše metodou PCR. Fylogenetickou analýzou byla v potravinách prokázána přítomnost kmenů *E. coli* náležejících do virulentních extraintestinálních skupin B2 a D. Genotypizací byl rovněž potvrzen výskyt genů *iss*, *papC*, *neuC*, *IucD*, *tsh*, *vat* a *eaeA*. U kolicinogenních kmenů *E. coli* byla prokázána přítomnost genů na produkci mikrocinu V a kolicinů B, M, U, Y, Ia, Ib, E1, E2, E7 a E8.

Klíčová slova: *Escherichia coli*, PCR, fylogenetické skupiny, faktory virulence, bakteriociny

ABSTRACT

Escherichia coli is a natural part of the intestinal microflora of warm-blooded animals, including humans. Man is beneficial not only to the production of antimicrobial compounds active against pathogenic bacteria, but also participation in the creation of certain vitamins. Some strains of *E. coli*, however, are pathogenic and can cause a variety of intestinal or extraintestinal diseases. The aim of this work was to classify *E. coli* isolates from food to the phylogenetic groups (A, B1, B2, D), detect virulence factors *iss*, *papC*, *neuC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, with selected strains of *E. coli* further *VT1*, *VT2*, *CNF1*, *CNF2*, *ST1*, *ST2*, *LT1*, *eaeA*, *Einv* and *Eagg* and detect the type of bacteriocin of colicinogenic strains (24 colicins and 8 microcins), by PCR method. Phylogenetic analysis showed the presence of *E. coli* belonging to the virulent extraintestinal group B2 and D in food. The presence of *iss*, *papC*, *neuC*, *IucD*, *tsh*, *vat* and *eaeA* genes was confirmed by genotyping. The production of microcin V and colicins B, M, U, Y, Ia, Ib, E1, E2, E7, and E8 was showed in colicinogenic *E. coli* strains.

Keywords: *Escherichia coli*, PCR, phylogenetic group, virulence factors, bacteriocins

Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří mi zapůjčili potřebnou literaturu nebo mě jakkoliv podporovali při psaní diplomové práce. Rovněž chci poděkovat mé vedoucí Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za pozornost, kterou věnovala mé práci, za její rady a také vstřícný přístup při řešení různých problémů souvisejících s vypracováním této diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	12
2 DIAGNOSTICKÉ METODY	15
2.1 MIKROBIOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA.....	15
2.2 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA.....	18
2.2.1 Southern blotting	18
2.2.2 Polymerázová řetězová reakce	19
2.2.3 Modifikace PCR reakce	22
2.2.4 Elektroforéza	23
2.2.5 Biočipové technologie.....	24
3 ROZDĚLENÍ DO FYLOGENETICKÝCH SKUPIN	26
4 VIRULENCE A PATOGENITA	30
4.1 FAKTORY PATOGENITY	30
4.2 FAKTORY VIRULENCE	31
4.2.1 Patogenní kmeny způsobující intestinální onemocnění	31
4.2.2 Patogenní kmeny způsobující extraintestinální onemocnění	32
5 BAKTERIOCINY	34
5.1 KOLICINY	34
5.2 MIKROCINY	35
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
6 CÍL PRÁCE	37
7 MATERIÁL	38
7.1 PŘÍSTROJOVÁ TECHNIKA.....	38
7.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA	39
7.3 CHEMIKÁLIE	39
7.4 POUŽITÉ PRIMERY	40
7.4.1 Primery pro stanovení fylogenetických skupin	40
7.4.2 Primery pro stanovení faktorů virulence	40
7.4.3 Primery pro bakteriocinotypizaci	42
7.5 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	44
7.6 POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY	44
8 METODY	47
8.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ DNA	47
8.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO PCR	47
8.2.1 Amplifikační směsi pro stanovení fylogenetických skupin.....	47

8.2.2	Amplifikační směsi pro stanovení faktorů virulence	48
8.2.3	Amplifikační směsi pro bakteriocinotypizaci.....	49
8.3	AMPLIFIKACE PCR.....	51
8.4	DETEKCE PCR PRODUKTŮ.....	52
9	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	53
9.1	FYLOGENETICKÁ ANALÝZA	53
9.1.1	Detekce produktů PCR reakce	53
9.1.2	Vyhodnocení výsledků	55
9.2	DETEKCE FAKTORŮ VIRULENCE.....	57
9.2.1	Detekce produktů PCR reakce	58
9.2.2	Vyhodnocení výsledků	60
9.3	DETEKCE PRODUKCE BAKTERIOCINŮ.....	65
9.3.1	Detekce produktů PCR reakce	65
9.3.2	Vyhodnocení výsledků	66
	ZÁVĚR	70
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	72
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	84
	SEZNAM OBRÁZKŮ	85
	SEZNAM TABULEK.....	88

ÚVOD

Bakterii *Escherichia coli* řadíme do čeledi *Enterobacteriaceae* a je jedním z nejdůležitějších zástupců střevní mikroflóry. Poprvé byla popsána koncem 19. století Theodorem Escherichem. Přítomnost bakterie v tlustém střevě je důležitá pro správné fungování trávicích procesů. Některé kmeny jsou však patogenní a mohou způsobovat řadu onemocnění. Fekálním znečištěním se může dostávat do vody, kde může přežívat řadu týdnů a často se proto využívá jako indikátor fekálního znečištění pitné vody.

U *E. coli* bylo během let výzkumů popsáno několik fylogenetických skupin. Rozřazení do skupin se nejčastěji provádí pomocí multilokusové enzymové elektroforézy či nověji pomocí PCR. Ta je založena na detekci genů *chuA*, *ajaA* a fragmentu *TspE4.C2*. Pomocí této metody je možné *E. coli* řadit do čtyř skupin – A, B1, B2 a D.

Bakterie *E. coli* je podmíněně patogenní mikroorganismus a za určitých podmínek tak dokáže vyvolávat různá onemocnění. Její patogenita je dána přítomností specifických faktorů virulence. Vyvolávat může dva typy onemocnění. Prvním je intestinální onemocnění, které se týká střevních infekcí a průjmů. Druhým je extraintestinální a způsobuje především infekci močových cest, septické onemocnění, infekci ran či hnisavé procesy.

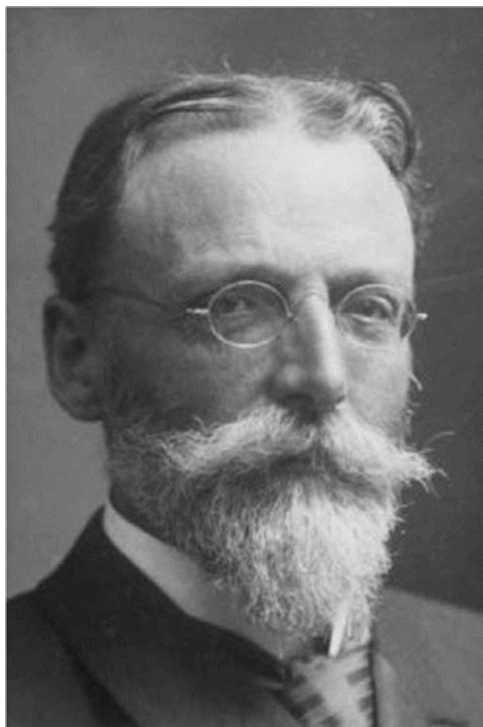
E. coli je rovněž významným producentem různých bakteriocinů. Jedná se o rozmanitou skupinu antimikrobních látek bílkovinné povahy. Bakteriociny, které produkuje *E. coli*, je možné rozdělit na dvě skupiny – koliciny a mikrocin. První bakteriocin byl z *E. coli* izolován již v roce 1925 a jednalo se o kolicin V.

Významné jsou rovněž i možnosti diagnostiky *E. coli*, které je možné provést po stránce mikrobiologické, nebo pomocí molekulárně biologických metod. Mikrobiologická diagnostika je založena především na použití selektivně diagnostických pěst, jako je TBX chromogenní agar či MacConkey agar. Rovněž je možné použít i speciálních mikrotestů, např. enterotesty. Molekulárně biologické metody jsou založeny na průkazu nukleových kyselin získaných z bakterií a nejvyužívanější metodou je polymerázová řetězová reakce, kterou zavedl Kary B. Mullis.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli byla objevena německo-rakouským pediatrem a bakteriologem Theodorem Escherichem (Obr. 1) roku 1885. Tuto bakterii označil jako *Bacterium coli commune* a prvně se o ní zmínil ve svém díle z roku 1886 *Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung*, kde ji spojil s časnou kolonizací střeva novorozenců [1]. O deset let později byla popsána jako *Bacillus coli* [2], následně roku 1919 byla bakterie na návrh Castellaniho a Chalmerse na jeho počest přejmenována na *Escherichia coli* [1].



Obr. 1. Theodor Escherich [1].

V současné době je *Escherichia coli* nejprozkoumanějším mikrobiálním druhem, často slouží jako modelový mikroorganismus pro genové a klinické studie. Rovněž se jedná o první bakteriální druh, u kterého byla pozorována a popsána výměna genetického materiálu konjugací. O tento objev se zasloužil Joshua Lederberg roku 1947 [3, 4].

Taxonomicky se *Escherichia coli* zařazuje následovně:

Doména *Bacteria*

Bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu

Kmen *Proteobacteria*

Třída *Gammaproteobacteria*

Řád *Enterobacteriales*

Čeleď *Enterobacteriaceae*

Rod *Escherichia*

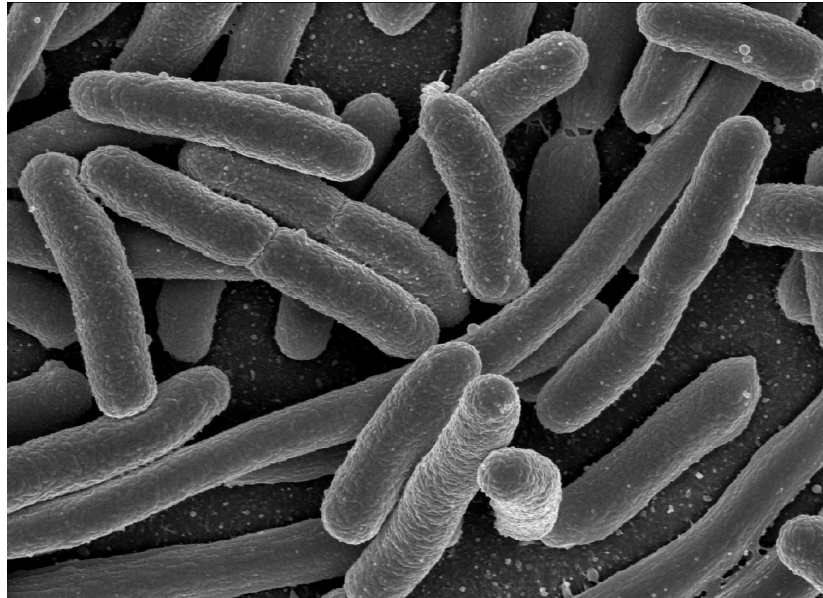
Druh *Escherichia coli*

Rod *Escherichia* zahrnuje dohromady 8 blíže specifikovaných druhů - *Escherichia albertii*, *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia faecalis*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia senegalensis* a *Escherichia vulneris*. Nejvýznamnější je právě *E. coli*, u které během dlouhých let výzkumu byly izolovaný již stovky různých kmenů s různými vlastnostmi [5].

Morfologické a fyziologické vlastnosti

Escherichia coli (Obr. 2) je krátká, rovná, gramnegativní tyčinka. Její velikost se pohybuje kolem 2-3 µm na délku a 0,6 µm na šířku. Netvoří spory, ale je schopná se pohybovat pomocí bičíků [7, 8]. Ty jsou složeny z flagelinu a jsou vysoce antigenní – díky H antigenům [9].

Vnější membrána bakterie je pokryta lipopolysacharidem a skládá se z lipidové dvojvrstvy. Buněčná stěna *E. coli* se skládá z tenké vrstvy peptidoklykanu. Pod ní se nachází cytoplazmatická membrána, která je tvořena z proteinů, fosfolipidů a lipopolysacharidů. V cytoplazmě se nachází rozpuštěné organické i anorganické látky a také velké množství ribozomů, díky čemuž je dělení bakteriálních buněk velmi rychlé – při optimálních podmínkách činí doba generace cca 20 minut. Rovněž se zde nachází molekula DNA. Její velikost u *E. coli* K-12 je kolem 4700 kbp a kóduje asi 4400 proteinů [3, 10, 11].



Obr. 2. *Escherichia coli* (upraveno) [6].

E. coli je fakultativně anaerobní, je tedy schopna využívat respirační i kvasný metabolismus. Cukry zkvašuje za tvorby plynu a kyselin, tvoří se hlavně kyselina mléčná, pyrohroznová, mravenčí, octová a rovněž plyny – oxid uhličitý a vodík. Roste při teplotách od 10 °C – 50 °C, optimální teplota růstu činí 37 °C – jedná se tedy o mezofilní mikroorganismus. Vhodné je neutrální pH, avšak dokáže růst i při pH pod 4,4. Minimální vodní aktivita nutná pro růst činí 0,95. Po biochemické stránce produkuje indol a je kataláza pozitivní. Naopak neprodukuje sirovodík, a je oxidáza negativní. Tyto její vlastnosti se využívají pro její identifikaci na Enterotestu [3, 12]. *E. coli* se rovněž podílí na tvorbě některých vitamínů (vitamín K, B1) a produkuje koliciny, které brání rozšíření patogenních bakterií [13, 14].

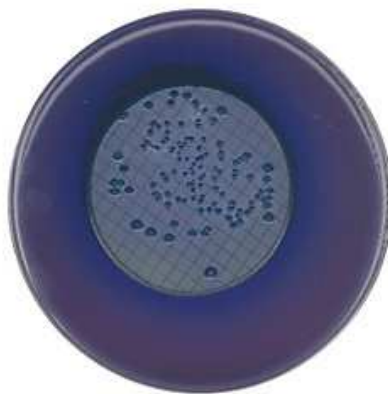
2 DIAGNOSTICKÉ METODY

Diagnostické metody pro *E. coli* můžeme rozdělit na mikrobiologické, kde řadíme kultivaci na živných půdách, Enterotest či barvení dle Grama a na molekulárně biologické s metodou PCR a jejími různými modifikacemi.

2.1 Mikrobiologická diagnostika

m-FC agar

Živná půda m-FC Agar (Obr. 3) se využívá ke stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli* dle protokolu TNV 75 7835. Jedná se především o druhy, které mají schopnost ve druhém stupni kultivace hydrolyzovat specifickým enzymem β -D-glukuronidázou v médiu obsažený 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glukuronid. Vzniká tak 4-methyl-umbelliferon, který v dlouhovlnném UV záření vykazuje světle modrou fluorescenci [15].



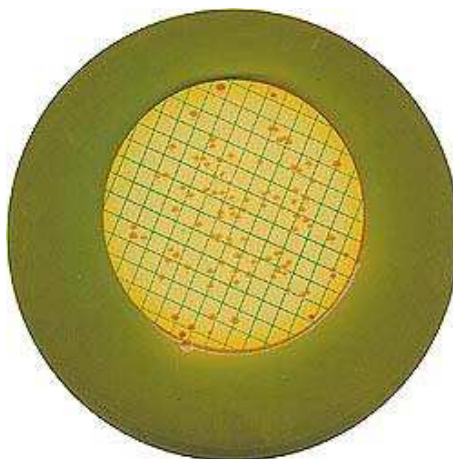
Obr. 3. m-FC Agar [16].

U zkoušeného vzorku se provede filtrace přes membránový filtr. Následuje primární kultivace, kdy se filtr klade na živnou půdu. Kultivuje se 18 h až 24 h při teplotě $44\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Po skončení kultivace se počítají kolonie termotolerantních koliformních bakterií. Počítají se laktóza pozitivní - modře zbarvené kolonie. Poté se provádí druhá kultivace, kdy se přenesou filtr na kultivační médium nasycené MUG (kultivační přípravek obsahující 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glukuronidu). Kultivuje se při $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ po dobu 2 hod. Po skončení kultivace se z misek sundají víčka a pozorují se v zatemněné místnosti

pod UV lampou, která emituje záření o vlnové délce 360 nm. Počítají se kolonie, které vykazují světle modrou fluorescenci [15].

TTC laktózový agar s tergitolem

Jedná se o komplexní médium, které obsahuje laktózu, pepton, kvasničný a masový extrakt, Tergitol 7 (heptadecyl sulfonan sodný pro potlačení plazivého růstu), bromthymolovou modř (acidobazický indikátor ke zjištění produkce kyseliny) a TTC (triphenyltetrazolium chlorid), který jsou schopné některé kmeny redukovat na červený formazan. Při pH 7,2 má médium tmavozelenou až tmavomodrozelenou barvu, při snížení pH zežloutne, naopak při jeho zvýšení zmodrá. Laktázopozitivní kmeny bakterií rostou jako žluté až oranžové kolonie (viz Obr. 4), laktázonegativní kmeny jako fialové kolonie [17].



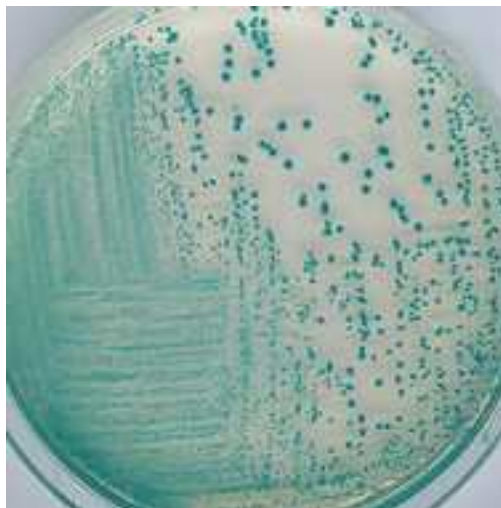
Obr. 4. TTC agar s laktózou a Tergitolem [19].

Živná půda se používá především pro mikrobiologickou kontrolu pitné vody pomocí membránové filtrace určeného objemu vzorku. Kultivuje se poté aerobně při teplotě 36 ± 2 °C po dobu 21 ± 2 hodiny. Konfirmovat lze poté provedením indol testu [18].

TBX Chromogenní agar

Jedná se o selektivní médium určené k detekci a stanovení počtu *E. coli* v potravinách. Součástí půdy je kaseinový pepton, x-β-glukuronid, žlučové soli a agar. Při 25 °C činí výsledné pH 7,2. Chromogenní látka x-β-D-glukuronid je určena pro detekci přítomnosti enzymu glukuronidázy, která je pro *E. coli* specifická. *E. coli* absorbuje chromogenní látku x-β-D-glukuronid a vnitrobuněčná glukuronidázová aktivita rozštěpí vazbu mezi chromoforem a glukuronidem. Uvolněný chromofor se zabuduje do buněk a způsobí modro-zelené

zabarvení *E. coli* (Obr. 5). Žlučové soli zde mají roli inhibitoru jiných grampozitivních mikroorganismů a rovněž potlačují koliformní bakterie. Kultivace média probíhá při teplotě 37 a 44 °C po dobu 18-24 hodin [20].



Obr.5. TBX chromogenní agar [21].

MacConkey agar – se sorbitolem

MacConkey agar se sorbitolem je selektivní živná půda, která slouží pro izolaci především *E.coli* O157:H7. Médium obsahuje D-sorbitol pro izolaci a rozlišení enteropatogenních serotypů *E. coli*, které nemají schopnost fermentovat sorbitol. Další složkou jsou peptony, které slouží jako zdroj dusíku. Žlučové soli a krystalová violet jsou selektivní látky inhibující růst grampozitivních mikroorganismů. Dále se zde nachází NaCl, agar a neutrální červeně jako indikátor pH. Naočkované médium se kultivuje 18 až 24 hodin při teplotě 35 až 37 °C. *Escherichia coli* O157:H7 (sorbitol negativní) se projevuje velice dobrým růstem bezbarvých až béžových kolonií, *Escherichia coli* ATCC 25922 (sorbitol pozitivní) roste za vzniku růžových až světle růžových kolonií [22].

Endo agar

Endo agar je selektivní médium určené pro izolaci a diferenciaci skupiny mikroorganismů z čeledi *Enterobacteriaceae*. Médium se skládá z peptické natráveniny zvířecí tkáně, laktózy, kterou koliformní bakterie fermentují za vzniku tmavě růžových až červených kolonií, dále hydrogenfosforečnanu draselného, agaru a selektivních látek šičičitanu sodného a základního fuchsinu, které částečně potlačí růst grampozitivních mikroorganismů. Hodnota pH živné půdy při 25 °C činí $7,5 \pm 2$. Inkubace po naočkování probíhá při teplotě 35 až 37

°C po dobu 18 až 24 hodin. Růst *E. coli* se vyznačuje vznikem růžových až červených kolonií se zeleným kovovým leskem, přičemž může dojít i ke zčervenání média. [23, 24].

EC bujón

Jedná se o selektivní médium pro detekci a stanovení počtu *E. coli* ve vodě, mléku a potravinářských výrobcích. Skládá se z tryptonu, laktózy, žlučových solí, fosfátu draselného, dihydrogenfosforečnanu draselného a NaCl. Žlučové soli inhibují rozvoj sporulujících bakterií a enterokoků. Růst *E. coli* se projeví vznikem zákalu společně s produkcí plynů. Postupuje se celkem ve dvou krocích: nejdříve se očkuje selektivní médium Lauryl-sulfát tryptózový bujón při normální a dvojitě koncentraci, následně se provede přesun pozitivních kultur do druhého selektivního média EC bujónu a pro produkci indolu v peptonové vodě. Obě média se inkubují po dobu 24 hodin při teplotě 44 °C [25].

Enterotest

Jedná se o komerčně vyráběnou soupravu sloužící k identifikaci významných druhů střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Testovací soupravu tvoří jamky s dehydratovanými diagnostickými médii. Jednotlivé jamky se inokulují a nechají se inkubovat předepsanou dobu. Poté se jamky vyhodnotí a provede se identifikace bakterie [26].

Gramovo barvení

Barvení dle Grama je diagnostické barvení, které se používá při pozorování bakterií přes mikroskop. Lze tak snadno zjistit, jaký tvar a jaké útvary bakterie vytvářejí a rovněž poskytuje informace o tom, zda-li daná bakterie je grampozitivní, či gramnegativní [27].

2.2 Molekulárně biologická diagnostika

V současné době je již známa celá řada různých metod využívaných pro účely molekulární diagnostiky. Dvě z nich lze prohlásit za zcela základní a ostatní z nich vyplývající. Jedná se o Southern blotting a polymerázovou řetězovou reakci (PCR) [28].

2.2.1 Southern blotting

Jedná se o klasickou metodu analýzy DNA využívanou pro účely molekulárně genetické diagnostiky před zavedením metody PCR [28]. Pojmenována byla podle Edwarda M. Southerna, který přišel s tímto postupem na univerzitě v Edinburgu roku 1970 [29]. Principem

je štěpení testované DNA restrikcími endonukleázami, separaci vzniklých fragmentů na gelu při elektroforéze, následný přenos fragmentů na membránu a hybridizaci radioaktivně značené sondy s DNA, která je zakotvená na membráně. Poté se provede autoradiografické vyhodnocení membrány. V místech komplementárně navázané sondy je možné detekovat radioaktivní záření. Tato metoda je však složitá a drahá a dnes se využívá již převážně jen pro vědecké účely [28, 30].

2.2.2 Polymerázová řetězová reakce

PCR (polymerázová řetězová reakce) je jednou z metod molekulární biologie, která se používá k množení specifického úseku DNA *in vitro* [31]. S myšlenkou PCR přišel poprvé Kary Mullis v roce 1983, kdy byl zaměstnancem firmy Cetus Corporation [32]. Původní DNA polymeráza použitá pro PCR byla extrahována z bakterie *E. coli*. Ovšem ukázalo se, že není příliš vhodná, zvláště s ohledem na její citlivost při používání vyšších teplot při PCR, kdy musel být na začátku každého nového cyklu použit nový enzym. Tento problém byl později vyřešen použitím DNA-polymerázy z bakterie *T. aquaticus* žijící v horkých pramenech a tak vykazující mnohem lepší termostabilitu [33, 34]. V roce 1993 dostal K. Mullis za tento objev Nobelovu cenu [35].

Komponenty pro PCR:

- **Templátová DNA** – Jedná se o původní DNA, která byla izolována ze vzorku (různé mikroorganismy, bioptické vzorky, stěry, z buněk z tkáňových kultur aj.). Nejdříve dochází k počáteční denaturaci, kdy se získají jednořetězová vlákna, která slouží jako templát. Kopie úseku DNA jsou poté syntetizovány dle templátu pomocí enzymu DNA-polymerázy na principu komplementarity bází [31].
- **Směs nukleotidů dNTP** – Jde o vodný roztok obsahující ultračistou směs každého ze čtyř dNTP – dATP, dCTP, dGTP, dTTP, při pH 7,5 [36].
- **DNA polymeráza** – Na začátku každého cyklu je nutné provést denaturaci templátové DNA vysokou teplotou – ta ovšem ničí normální DNA polymerázy. Proto je nutné při PCR využívat termostabilní polymerázy. Tyto enzymy pocházejí z bakterií, které obvykle žijí v extrémních podmínkách a dokáží tak po určitou dobu odolávat i teplotám kolem 95 °C. Nejčastěji používanou polymerázou je TAQ-polymeráza pojmenovaná dle bakterie *Thermus aquaticus* [37].

- **Primery** – Obvykle se jako primery používají dva uměle připravené krátké oligonukleotidy, které dosahují délky kolem 18-30 bází. Odvozuji se z koncových sekvencí DNA určené k amplifikaci. Jakmile se přidá DNA-polymeráza a nukleotidy, začne probíhat syntéza nových řetězců na obou matricových řetězcích protisměrně [38].
- **Pufr** – PCR pufr vytváří optimální podmínky pro činnost DNA-polymerázy. Často obsahuje Tris-HCl, KCl, někdy i $MgCl_2$. Obvykle bývají dodávány v 10x koncentraci a je doporučováno používat pufr dodávaný výrobcem polymerázy [39].
- **$MgCl_2$** – Chlorid hořečnatý slouží v PCR jako kofaktor při reakčním procesu. Funguje jako katalyzátor, kdy se při reakci sice nespotebovává, avšak samotná reakce bez jeho přítomnosti nemůže proběhnout. Přidání většího množství hořčíku urychlí reakci, avšak pokud jej bude až příliš mnoho, bude DNA-polymeráza pracovat příliš rychle a může docházet k chybám při procesu kopírování. Pokud naopak bude hořčíku málo, reakce pojedje jen velmi pomalu, nebo vůbec [40].

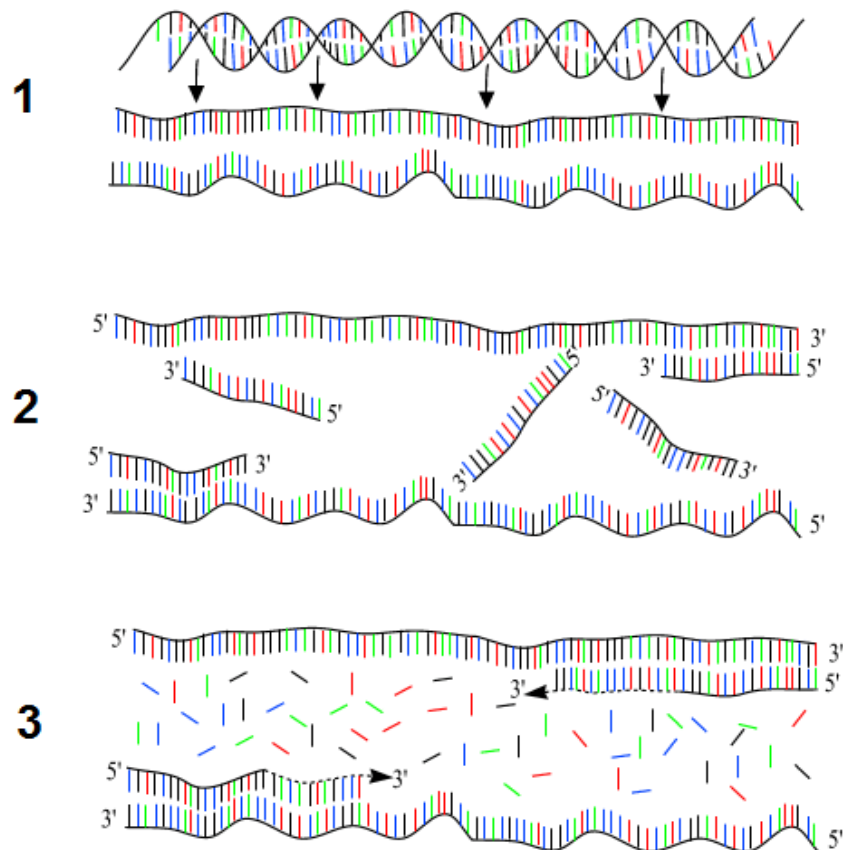
Princip PCR

Principem PCR je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvojřetězcové DNA. Dochází k ní po připojení dvou primerů, které se váží na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'OH-konce směřují proti sobě. Celý proces, jak vyjadřuje obrázek č. 6, lze rozdělit na tři základní kroky: 1. denaturace, 2. annealing, 3. extenze [38].

Počáteční denaturace – dochází k separaci řetězců DNA, probíhá obvykle za teplot kolem 94 °C po dobu 2 až 5 minut.

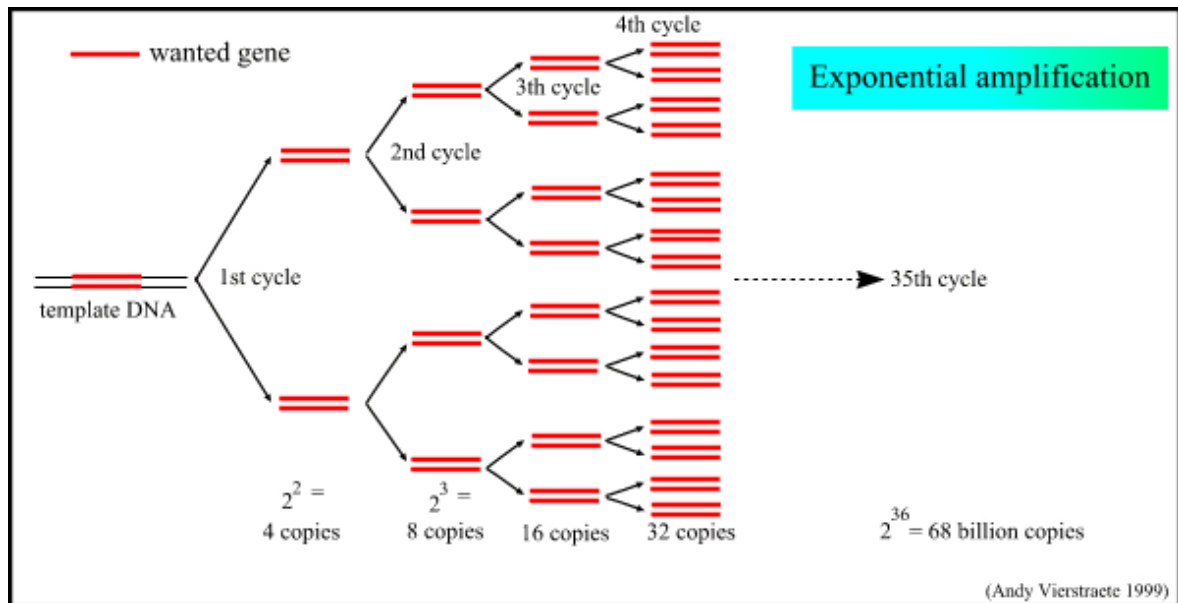
1. Denaturace – reakční roztok se nejprve zahřívá na denaturační teplotu, kdy dochází k rozvolnění dvojřetězcové DNA. Probíhá při teplotách 94 až 98 °C po dobu 20 až 45 sekund.
2. Annealing – dochází ke snížení teploty na 30 až 65 °C, specifické primery se začnou vázat na segmenty cílových DNA na principu komplementarity dusíkatých bází. Proces trvá přibližně 30 až 90 sekund.
3. Extenze – teplota se opět zvyšuje, syntetizuje se komplementární řetězec DNA. DNA-polymeráza nasedne na primery a začne připojovat volné nukleotidy k vláknu DNA. Proces probíhá při teplotách kolem 65 až 75 °C po dobu 45 až 90 sekund.

Závěrečná polymerační reakce – dochází k dosyntetizování řetězců, obvykle při teplotách kolem 72 °C po dobu 5 minut [31, 38, 41].



Obr. 6. Průběh PCR [31].

PCR reakce se provádí v zařízeních zvaných termocyklery, ve kterých se teploty mění dle předem naprogramovaných časových intervalů zcela automaticky. Přesné hodnoty teplot i časů jednotlivých kroků je nutné optimalizovat dle délky amplifikovaného úseku DNA a dané sekvence primerů. Pro samotné zahájení reakce stačí velmi malé množství templátové DNA – teoreticky postačí jen jedna molekula [38]. Kroky 1. – 3. se opakují v cyklech, kdy v každém cyklu dochází ke zdvojnásobení počtu kopírovaných molekul DNA [41], jak vyjadřuje obrázek č. 7. Celkový počet cyklů obvykle dosahuje kolem 25 až 30. Výsledným produktem jsou poté fragmenty DNA, které se následně vyhodnocují, nejčastěji gelovou či polyakrylamidovou elektroforézou [38, 41].



Obr. 7. Exponenciální amplifikace [42].

2.2.3 Modifikace PCR reakce

- **Reverzní PCR** – Pro reverzní PCR (RT-PCR) lze jako templát použít RNA. Tato metoda využívá reverzní transkriptázu, která přepisuje RNA do cDNA. Ta se poté amplifikuje standardním postupem. Jedná se o citlivou metodu k určování aktivních genů v buňce [38, 43].
- **Inverzní PCR** – Pomocí této metody je možné amplifikovat úseky DNA o neznámé sekvenci, která je ohraničena známými sekvencemi. Celý proces lze rozdělit do dvou kroků, kdy nejdříve dochází ke štěpení DNA v místě neznámých sekvencí a cirkularizace vzniklého fragmentu. Následně se připojují protisměrně primery na DNA o známé sekvenci a dochází k amplifikaci vnitřního úseku, který vznikl spojením sekvencí neznámé DNA [38].
- **Asymetrická PCR** – Při asymetrické PCR je v reakci použit vždy jen jeden primer (přímý, či zpětný) a dochází k amplifikaci pouze jednoho ze dvou řetězců – tzv. lineární amplifikace. Metoda se využívá při automatickém sekvencování [44].
- **Multiplex PCR** – Jedná se o náročnou metodu, kde se amplifikuje několik produktů v jedné reakci. Tato metoda často potřebuje rozsáhlou optimalizaci reakčních podmínek, protože často dochází ke vzniku primer-dimer formací a jiných nespecifických produktů, které mohou interferovat s amplifikací specifických produktů.

Toho se lze vyvarovat použitím například hot-start PCR a dalšími způsoby, jako volba vhodného PCR pufru či vhodná koncentrace primerů [45]. V rámci Multiplex PCR byla vytvořena nová metoda zvaná Univerzální Multiplex PCR (UM-PCR), která slouží k zesílení více cílových fragmentů z genomové DNA. Tato metoda může rychle odhalit genetickou čistotu kukuřičných semen, rovněž ji lze využít k analýze polymorfismů, ke kvantitativnímu stanovení a identifikaci druhu [46].

- **Nested PCR** – Velice citlivá metoda, amplifikace probíhá ve dvou krocích. V první fázi je během 15 – 30 amplifikačních cyklů pomocí jedné dvojice primerů namnožena delší sekvence nukleové kyseliny. Poté dojde k přenesení amplikonů do druhé amplifikační zkumavky, ve které je obsažena druhá dvojice primerů. Které jsou specifické k vnitřnímu úseku amplikonů. Následně nastává druhá fáze, kdy během dalších 15 – 30 cyklů je amplifikována kratší vnitřní sekvence. Poté se již provádí detekce, nejčastěji gelovou elektroforézou. Výhodou metody je vysoká výtěžnost a specifita [47].
- **Real time PCR** – Vychází z klasické PCR, pomocí speciálního přístroje je možné kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu. Je zde nutná přítomnost fluorescenčního substrátu. Ten se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence poté vyjadřuje množství nesyntetizované nukleové kyseliny [48].

2.2.4 Elektroforéza

Jedná se o nejčastěji používanou separační techniku při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Principem je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli, kdy hlavním nositelem náboje u nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny. V elektrickém poli se nukleové kyseliny pohybují směrem k anodě [49].

Gelová elektroforéza se provádí ve vhodném nosiči, kterým bývá právě gel. Ten je tvořen polyakrylamidem či agarózou a vytváří složitou síťovou strukturu s póry, kdy jejich velikost se nejčastěji ovlivňuje koncentrací polymeru. Polyakrylamidové gely se používají při separaci menších molekul (10 – 1000 bp), agarózové gely zase pro separaci větších molekul od 100 bp až do 50 kb. Dle polohy gelu lze potom rozlišovat elektroforézu na verti-

kální a horizontální. Gel se následně vkládá do elektroforetické vaničky (Obr. 8), ve které probíhá vlastní elektroforéza [49].



Obr.8. Elektroforetická vanička [50].

Rychlost pohybu molekul DNA v gelu se označuje jako elektroforetická pohyblivost a je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Velikost Molekuly DNA či fragmentu lze stanovit srovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul či fragmentů DNA o již známé velikosti – standardy [49].

Po skončení elektroforézy je třeba následně provést detekci produktů a jejich polohy. Okem nejsou viditelné, je však možné je zviditelnit obarvením. Nejčastěji se k tomuto účelu využívá etidiumbromid. Ten se dostane mezi sousední páry bází v DNA za vzniku komplexu, po ozáření UV světlem následně fluoreskuje. Molekuly DNA jsou poté patrné jako proužky [49].

2.2.5 Biočipové technologie

Klasické metody molekulární biologie jsou obvykle zaměřeny na studium malého počtu genů a je poměrně obtížné charakterizovat různé vzájemné interakce většího počtu genetických faktorů. Biočipové technologie však umožňují simultánní testování tisíce genů v rámci jednoho vzorku. Na základě počtu pracovních jednotek a velikosti lze biočipy rozdělit na makročipy (macroarrays) a mikročipy (microarrays), které mohou na svém povrchu nést tisíce až desetitisíce jednotek. Pro výrobu nosičů se využívají nylonové membrány a plastické či skleněné materiály. Výhodou plastických či skleněných čipů je efektivní nanášení sond – počet i jejich kvalita, snadnější manipulace a možnost automatizace. Nylonové membrány je však možné používat opakovaně a jsou tak finančně dostupnější. Jsou

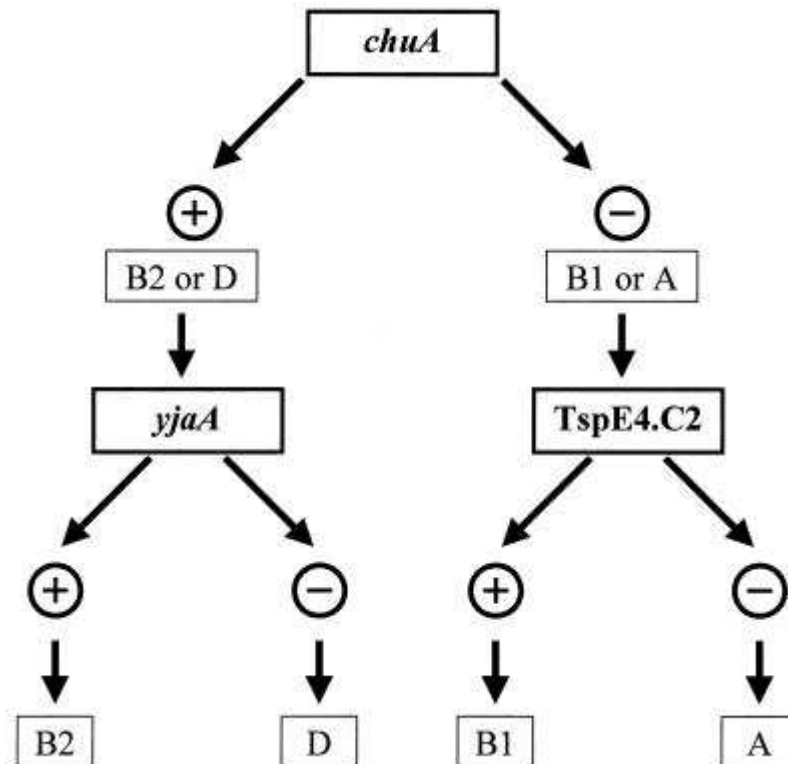
známy dvě možnosti pro přípravu oligonukleotidových sond. První z nich je syntéza oligonukleotidů mimo nosič, na který jsou později kovalentně připojeny. Druhou možností je využití fotolitografické metody. Zde syntéza oligonukleotidů probíhá přímo na nosiči. Podstatou čipových metod je hybridizace vzorku k sondě na základě komplementarity. Poté se provádí detekce navázaných molekul. Způsob detekce závisí na způsobu značení – radioaktivní, fluorescenční či chemické. Pro radioaktivní značení se používají radioizotopy fosforu - ^{32}P či ^{33}P , v případě fluorescenčního značení se využívají cyaniové barvy, nejčastěji Cy3 a Cy5. Biočipové techniky je možné použít pro genotypizaci, ke sledování genové exprese, pro detekci genetických polymorfismů či pro sekvencování [51, 52].

3 ROZDĚLENÍ DO FYLOGENETICKÝCH SKUPIN

U bakterie *Escherichia coli* je již delší dobu uznávána existence odlišných fylogenetických skupin. V současnosti takto rozlišujeme celkem čtyři základní fylogenetické skupiny – A, B1, B2 a D. Skupiny A a B1 jsou považovány jako sesterské, skupina B2 dle některých reprezentuje rodovou linii *E. coli*. Kmeny, náležející do těchto čtyř skupin, se liší ve svých fenotypových vlastnostech, např. schopnosti využívat různé cukry, odolnost vůči antibiotikům či jejich tempo růstu. Rozdíl lze nalézt i ve velikosti genomu, kdy kmeny náležející do skupiny A a B1 mají genomy menší oproti kmenům ve skupině B2 a D. Další rozdíly lze nalézt také v oblasti jejich výskytu a sklonu způsobovat onemocnění. Skupiny B2 a D jsou méně často izolovány z okolního prostředí, ryb, žab či plazů, než skupiny A a B1. U skupiny B2 zase bylo prokázáno, že přetrvávají delší období u kojenců, než ostatní kmeny *E. coli* [53]. Uropatogenní *E. coli* (UPEC) například patří mezi hlavní patogeny, které způsobují infekce močových cest, obzvláště u dětí. Virulentní extraintestinální kmeny v tomto případě patří hlavně do fylogenetické skupiny B2 a D, kdežto méně virulentní komenzální kmeny náleží k fylogenetické skupině B1 či A [54, 55].

Rozřazení kmenů *E. coli* do fylogenetických skupin lze provést několika způsoby. Jedná se o multilokusovou enzymovou elektroforézu (MLST) nebo ribotypizaci. Obě tyto metody jsou však dost složité a také časově náročné a vyžadují databázi popsaných kmenů. V roce 2000 však Clermont O. se svými spolupracovníky přišel s novou metodou pro určení fylogenetické skupiny *E. coli* na základě detekce PCR z genů *chuA*, *yjaA* a fragmentů *TSPE4.C2*. Tato metoda lze provádět v režimu triplex PCR, kdy se geny *chuA*, *yjaA* a fragmenty *TSPE4.C2* amplifikují současně. *E. coli* je poté rozdělována do skupin dle dichotomického klíče v závislosti na přítomnosti, či nepřítomnosti daného genu (Obr. 9) [56].

Později však bylo zjištěno, že rozdělování do skupin dle Clermonta, není až tak přesné, jak se původně myslelo. Úspěšnost této metody dle jedné studie, činí kolem 84%. U skupin B1 a B2 byla úspěšnost správného zařazení mnohem vyšší ve srovnání se skupinami D a A, kde byla pravděpodobnost chybného zařazení nejvyšší [53].



Obr.9. Dichotomický rozhodovací strom pro stanovení fylogenetické skupiny u *E. coli* [56].

Nedávno byla provedena nová studie za účelem zlepšit a zpřesnit zařazování kmenů *E. coli* do fylogenetických skupin. Byly navrženy nové primery k amplifikaci a přidán další pár primerů specificky zaměřených na glutamát dekarboxyláza-alfa gen (*gadA*) pro vnitřní kontrolu (Tab. 1). Bylo to z toho důvodu, protože předtím nebyly žádné jiné vnitřní kontroly pro případy zařazení kmenů do skupiny A v případě nepřítomnosti některého ze tří původních markerů. Velikost produktů pro nově navržené primery je srovnatelná s velikostmi navrženými Clermontem [57].

Tab. 1. Sekvence primerů pro modifikovaný fylogenetický test (upraveno) [57].

Primer	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost produktu (bp)
ChuA1	ATGATCATCGCGGCGTGCTG	281
ChuA2	AAACGCGCTCGCGCCTAAT	
YjaA1	TGTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT	216
YjaA2	ACCTGTGACAAACCGCCCTCA	
TspE4C2.1	GCGGGTGAGACAGAAACGCG	152
TspE4C2.2	TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG	
GadA1	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG	373
GadA2	GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC	

Byla vytvořena směs pro amplifikační reakci, ve které se nacházelo všech 8 primerů a byla provedena optimalizace. Reakce poté probíhala po 30 cyklů za následujících podmínek:

úvodní denaturace 94°C 4 minuty

1. Denaturace – 94°C 30 sekund
2. Annealing – 65°C 30 sekund
3. Extension – 72°C 30 sekund

závěrečná extenze 72°C 5 minut

Celkem bylo testováno 185 vzorků *E. coli*, u kterých již bylo známé zařazení do fylogenetické skupiny díky dřívějšímu rozřazení (MLST aj.). Dvě třetiny vzorků (121) přinesly stejné výsledky a byly tak přiřazeny do stejných fylogenetických skupin. U 64 izolátů se již výsledky lišily. U 54 z nich byly patrné produkty pro *TSPE4.C2* (45 vzorků), *yjaA* (9 vzorků). Tyto izoláty se řadily ke skupině D (3 vzorky), B2 (42 vzorků) a A (9 vzorků). Avšak tyto amplifikace neměly vliv na nové rozřazení těchto 54 vzorků. Modifikovaný test změnil fylogenetické skupiny celkem u 10 vzorků. Ve všech případech nové primery amplifikovaly nové produkty, které původní metodou nebyly zjištěny. Původní a nové výsledky vyjadřují Tabulky 2 a 3. Navíc použitím primerů pro *gadA* se podařilo zabránit nesprávnému zařazení 6 vzorků, kdy v prvním pokusu vyšlo vše dle původního zařazení. Nebyl avšak amplifikován ani gen *gadA*, což naznačovalo nedostatečnou kvalitu DNA. Pokus byl tedy znovu zopakován, tentokrát již s pozitivními výsledky [57].

Tab. 2. Původní metoda dle Clermonta (upraveno) [57].

Izolát	Původ	ChuA	YjaA	TSPE4.C2	Zařazení
SFESBL-788	Člověk	+	-	-	D
SFEcoli-65	Člověk	+	-	-	D
SFESBL-245	Dobytěk	-	-	+	B1
SFESBL-244	Drůbež	-	-	+	B1
EO41	Člověk	-	-	-	A
EO42	Člověk	-	-	-	A
EO72	Člověk	-	-	-	A
SFESBL-92	Člověk	-	-	-	A
SFESBL-196	Dobytěk	-	-	-	A
SFESBL-351	Drůbež	-	-	-	A

Tab. 3. Modifikovaná metoda dle Doumitha (upraveno) [57].

Izolát	Původ	gadA	ChuA	YjaA	TSPE4.C2	Zařazení
SFESBL-788	Člověk	+	+	+	-	B2
SFEcoli-65	Člověk	+	+	+	+	B2
SFESBL-245	Dobytěk	+	+	+	+	B2
SFESBL-244	Drůbež	+	+	+	+	B2
EO41	Člověk	+	-	-	+	B1
EO42	Člověk	+	-	-	+	B1
EO72	Člověk	+	-	-	+	B1
SFESBL-92	Člověk	+	+	+	+	B2
SFESBL-196	Dobytěk	+	+	-	+	D
SFESBL-351	Drůbež	+	+	-	+	D

Výhodou této nové modifikované metody je zvýšení citlivosti a spolehlivosti při rozdělování kmenů *E. coli* do fylogenetických skupin a rovněž dosažení lepší shody s daty MLST [57].

4 VIRULENCE A PATOGENITA

Organizmy se schopností využívat prostředí poskytující hostitelem a které svým metabolismem, jeho produkty a reakcí, jež způsobují u hostitele, jej mohou poškozovat či vyvolávat onemocnění, se nazývají patogeny. Patogenita je poté označována jako schopnost určitého druhu mikroorganismu vyvolat onemocnění konkrétního druhu hostitele [10] a jedná se o vlastnost kvalitativní. Virulence vyjadřuje stupeň patogenity a jedná se o vlastnost kvantitativní. Často je dána počtem mikroorganismů, které mohou onemocnění způsobit [58].

Kmeny mikroorganismů mohou být: vysoce virulentní – ty usmrtí většinu citlivých hostitelů, avšak ztrácí tím možnost dalšího šíření; virulentní, které v populaci přežívají, může se množit a přenášet na další jedince; a avirulentní [10], který nemá schopnost vyvolávat onemocnění [59]. Dále je možné mikrobiální druhy rozdělit dle vnímavosti hostitelského organismu na primárně patogenní a podmíněně patogenní. Za primární patogeny lze považovat pouze ty druhy, které mají schopnost vyvolat onemocnění u zdravého hostitele vybaveného nástroji rezistence a reagujícího specifickou imunitou. Podmíněně patogenní druhy jsou schopny být původci onemocnění jen v případech, kdy jsou poškozeny či narušeny přirozené obranné mechanismy (poranění kůže, sliznic, cizí tělesa v tkáni aj.) a při snížené imunitě hostitele. Zdrojem infekce podmíněnými patogeny poté může být vnější prostředí, ale rovněž i vlastní endogenní flóra [10].

4.1 Faktory patogenity

Velkou roli hrají faktory patogenity, které lze rozdělit do 3 oblastí: 1. přenosnost, 2. invazivita, 3. toxicita [58].

Přenosnost – přenos mikroorganismu do hostitele závisí na několika faktorech: na celkovém počtu mikroorganismů, infekční dávce, rezistenci vůči okolnímu prostředí a na chování hostitele [60].

Invazivita je dána schopností vstoupit do hostitele (adherence, pomnožení, penetrace), množit se a šířit se ve vnitřním prostředí hostitele. Bakterie používají různé způsoby, kterými se váží na buněčné povrchy. Adherují na komplementární struktury pomocí adhezinů – struktur na povrchu bakterie. Ty se váží na receptory, které jsou součástí eukaryotické buňky. *E. coli* může tvořit fimbrie, pomocí nichž se váže v močovém traktu (tzv. P fimbrie)

a rovněž v tenkém střevě člověka (CFAI, CFAII, E8775) i zvířat (K88, K99, 987P, F41). Receptory mohou být přítomny jen v určitém věkovém období, kdy např. enteropatogenní *E. coli* adheruje v tenkém střevě novorozenců, ale u dospělých již nikoliv. Rovněž vyvstává možnost blokáce receptorů příslušnou specifickou chemickou strukturou (u *E. coli* manózu) [10].

Bakterie se často podílí na produkci různých toxických látek. Tyto látky mohou aktivně transportovat do svého okolí – hovoříme o exotoxinech, nebo se uvolňují do svého okolí až po rozpadu bakterie – poté se jedná o endotoxiny [60]. *E. coli* se podílí na produkci termolabilních a termostabilních enterotoxinů [10].

4.2 Faktory virulence

Patogenní kmeny *E. coli* mohou vyvolávat dva druhy onemocnění: intestinální – jedná se o různé průjmové infekce a extraintestinální – infekce močových cest, pyogenní infekce či meningitidy u novorozenců [61].

4.2.1 Patogenní kmeny způsobující intestinální onemocnění

Enteropatogenní kmeny *E. coli* podle projevů virulence můžeme rozdělit následovně:

1. ETEC – enterotoxická *E. coli*: Je původcem průjmových infekcí cestovatelů, produkuje dva toxiny – termolabilní LT a termostabilní ST. Genetická informace pro tvorbu enterotoxinů je vázána na plazmidech. K adhezi dochází pomocí proteinových fimbrií, které jsou druhově specifické (člověk, sele, tele). Důsledkem jsou průjmy bez horečky [61, 62].
2. EPEC – enteropatogenní *E. coli*: Způsobuje průjmy novorozenců, často s krví, bez horečky, neprodukuje toxiny, je mírně invazní [62].
3. EIEC – enteroinvazní *E. coli*: Na sliznici dokáže přilnout pravděpodobně díky bílkovině vnější membrány. Následně pronikne do sliznice, kde se pomnoží. Ve stolici je velké množství krve a hlenu [62].
4. EAEC – enteroadherentní *E. coli*: Adheruje ke sliznici, následná infekce je mírná, neinvaduje [62].

5. EHEC – enterohemoragická *E. coli*: Často jsou také označovány jako shiga-like toxigenní *E. coli* (STEC) či verotoxigenní *E. coli* (VTEC). Způsobují krvavé průjmy a hemolyticko-uremický syndrom (HUS). STEC se dále dělí na 5 sérotypů (A-E). Mezi nejčastější séroskupiny patří O4, O5, O16, O26, O55, O111ab, O113, O117, O157 a O172. Nejznámějším sérotypem je O157:H7. Bakterie adherují pomocí fimbrií na mikrovili střevních epitelálních buněk. Následně dochází k aktivaci polymerace aktinu, přeskupení cytoskeletu uvnitř buněk a k vymizení mikrovili. Naruší se permeabilita membrány střevních buněk. Vznik lézí vede k odlupování epitelii, k zánětu a průjmu. Hlavním faktorem zde je produkce shigatoxinu, neboli verotoxinu. Při postižení ledvin dochází k poškození ledvinových tubulů, moč obsahuje krev a vyvíjí se HUS. Zdrojem je obvykle nepropečené maso, saláty, mošty či voda [62, 63].

4.2.2 Patogenní kmeny způsobující extraintestinální onemocnění

Mezi extraintestinální kmeny *E. coli* řadíme:

UPEC – uropatogenní *E. coli* (sérotypy 01,02,03,04,06,07,075,0150): Způsobuje infekce močových cest [64]. K významným faktorům virulence zde řadíme:

- Fimbriální adhesiny – obzvláště případnou přítomnost manózo-rezistentních P fimbrií, kdy v přítomnosti manózy není vazba P fimbrií nijak blokována. Nachází se hlavně u pyelonefritogenních klonů *E. coli*, u kmenů *E. coli* s urosepsí a kmenů perzistujících v urotraktu i ve stolici [64].
- V případě nefimbriálních adhezínů je možné zmínit:
 - Hemaglutininy, které je možné nejčastěji nalézt v moči gravidních žen s IMC (infekce močových cest).
 - Curli – mají vazebnou afinitu k sérovému proteinu fibronektinu.
 - Kapsulární (K) polysacharid – pouzderý polysacharid je amorfní nekonstantní povrchová struktura bakterií, jejíž tvorba je závislá na nutričních podmínkách. Kromě adherence je i nositelem virulence a invazivity. Má hydrofilní vlastnosti a tak uniká imunitním mechanismům [64].

- Lipopolysacharid (LPS komplex) – je tvořen lipidem A a polysacharidem somatického O antigenu. Lipid A je endotoxin, který se nachází v buněčné stěně bakterií. Jeho toxický účinek se může projevit při vysoké koncentraci, jehož příčinou je lýze velkého množství bakterií. Rovněž dokáže aktivovat makrofágy s produkcí TNF- α , IL 1 a IL 6. Přítomnost O antigenu po delší dobu vyvolá tvorbu anti O protilátek. Také se podílí na sérum rezistenci UPEC kmenů *E. coli* [64].
- Toxiny – Hemolysin α - jedná se o exotoxin, který má cytotoxický efekt na renální buňky v tubulech, invazivní vlastnosti a rovněž inhibiční vliv na fagocytózu.
 - Aerobactin, siderofory – proteiny, které vyhledávají Fe^{3+} pro metabolismus bakteriální buňky za účelem tvorby fimbrií. Produkce byla prokázána u pyelonefritogenních kmenů *E. coli* [64].

NMEC – kmeny *E. coli* způsobující neonatální meningitidu. *E. coli* je v tomto případě druhou nejčastější příčinou meningitidy u novorozenců, přičemž tyto kmeny se řadí převážně do fylogenetické skupiny B2 [65].

APEC – aviární patogenní *E. coli* – Způsobují kolibacilózu, což je jedna z nejvýznamnějších infekčních chorob, které postihují drůbež. Kolibacilózy mají mnoho forem a způsobují roční mnohamilionové ztráty v důsledku úmrtnosti i snížení výroby. I přes důležitost tohoto onemocnění zatím zůstávají mechanismy virulence do značné míry stále neznámé [66].

5 BAKTERIOCINY

Mikroorganismy disponují velkým množstvím různých obranných systémů. Patří sem širokospektrální antibiotika, vedlejší produkty metabolismu (kyselina mléčná), lytická činidla (lysozym), velká škála exotoxinů bílkovinné povahy a v neposlední řadě právě bakteriociny. Bakteriociny byly objeveny téměř u každého bakteriálního druhu, přičemž v rámci jednotlivých druhů byla prokázána produkce desítek či stovek různých druhů bakteriocinů [14]. Jedná se tedy o bohatou a různorodou skupinu ribozomálně syntetizovaných antimikrobiálních peptidů [67]. Na rozdíl od tradičních antibiotik bakteriociny disponují velice úzkým spektrem působnosti [14].

Produkce bakteriocinů je rovněž významnou charakteristikou u *E. coli* a několika dalších příbuzných druhů v čeledi *Enterobacteriaceae*. V rámci rodu *Escherichia* je jejich produkce téměř výlučně spojena s kmeny *E. coli*. Bakteriociny je možné rozdělit do dvou skupin – koliciny a mikrocinů [68]. Bylo zjištěno, že obě skupiny často produkují kmeny *E. coli* získané z lidských zdrojů, kdy z celkových 411 testovaných kmenů bylo 55% z nich pozitivních na produkci bakteriocinů. Takto relativně vysoký výskyt bakteriocinogenních kmenů *E. coli* u lidí izolovaných z gastrointestinálního traktu je pravděpodobně důsledkem jejich ekologické role v rámci mezidruhového soutěže bakterií ve střevním traktu lidí [69].

V rámci této oblasti probíhají rovněž výzkumy ohledně probiotických bakterií (kam je možné zařadit i *E. coli* Nissle 1917) a jejich produkce různých bakteriocinů, které mohou zlepšit jejich schopnost soutěžit s jinými gastrointestinálními bakteriemi, inhibovat tím patogenní bakterie a v konečném důsledku tak mít pozitivní vliv na zdraví hostitele [67, 70].

5.1 Koliciny

Koliciny jsou proteiny, které produkují některé kmeny *E. coli* a jsou toxické pro jiné příbuzné kmeny *E. coli*. První kolicin identifikoval belgický vědec André Gratia již v roce 1925 a byl označen jako kolicin V [71, 72]. Později byl avšak přeřazen do skupiny mikrocinů [73]. Po tomto objevu začaly být identifikovány další koliciny a v dnešní době jich známe celkem 34, z nichž podrobně je popsáno 26 [68]. Označení Kolicin zavedl Gratia a Fredericq roku 1946, kdy prokázali jejich bílkovinnou povahu a specifičnost jejich činných spekter [71].

Nově objevené koliciny dostaly své označení velkými písmeny z abecedy dle receptorové specifity. V případě, že se na jeden receptor váže více kolicinů, provádí se označení písmenem a číslem, např. kolicin E1 – E9. Koliciny je možné rozdělit do dvou skupin dle způsobu, jakým se dostanou přes buněčný obal do buňky, konkrétně skupina A a B. Skupina A využívá systému Tol, který obsahuje proteiny TolA, TolQ, TolR, TolB, Pal a řadíme sem koliciny A, E1 – E9, K, L, N, S4, U a Y. Skupina B využívá systému TonB, obsahující proteiny TonB, ExbB, ExbD a patří sem koliciny B, D, H, Ia, Ib, M, 5 a 10. Obecně platí, že skupina A je kódována malými plazmidy, zatímco skupina B je kódována velkými plazmidy. Některé koliciny však patří do jedné skupiny, ale sdílejí homologii s koliciny skupiny druhé – týká se to např. kolicinu 5 a 10 [71, 73].

Koliciny jsou produkovány bakteriemi *E. coli*, které v sobě mají ukryt jeden kolicinogenní plazmid – pCol. Existují dvě třídy pCol – typ I a typ II. Typ I jsou malé plazmidy o velikosti 6 – 10 kb a kódují hlavně koliciny ze skupiny A. Typ II jsou velké plazmidy o velikosti kolem 40 kb a kódují koliciny ze skupiny B, přičemž mohou nést i dva operony vedle sebe. Potom mohou produkovat například koliciny B a D, B a M, Ia a V [71].

5.2 Mikrocin

Mikrocin jsou ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy s nízkou molekulovou hmotností. Jsou produkovány bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*, obzvláště *E. coli*. Antibakteriálně působí především na příbuzné druhy. Syntézu mikrocinů výrazně zvyšují stresové podmínky pro bakterii, např. nedostatek živin. Je známo 14 mikrocinů [74], z toho 9 na molekulární úrovni, což umožňuje molekulární detekci odpovídajících genů [68]. Většina z těchto 14 mikrocinů je kódována plazmidem, byly však popsány i kódované chromozomálně. Jednotlivé kmeny *E. coli* mohou produkovat i více mikrocinů současně, např. kmen *E. coli* Nissle 1917 produkuje mikrocin M a H47 [74].

Mikrocin mohou být rozděleny na 2 třídy:

- Třída I – řadí se sem peptidy, jejichž molekulová hmotnost je nižší než 5 kDa. Jedná se o mikrocin B17, C7-C51, J25 a D93
- Třída II – zde se jedná o peptidy, jejichž molekulová hmotnost činí kolem 4,9 až 8,9 kDa. Patří sem mikrocin E492, H47, V, L a 24 [75, 76].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo u vybraného souboru kmenů *Escherichia coli* provést pomocí metody PCR následující analýzy:

- rozřadit kmeny *E. coli* do základních fylogenetických skupin (A, B1, B2, D);
- stanovit faktory virulence za pomoci tří skupin primerů (1. skupina - *iss*, *iucD*, *neuC*, *papC*, *tsh*, *vat*; 2. skupina – *cnf1*, *cnf2*, *STI*, *STII*, *VT1*, *VT2*, *LTI*; 3. skupina *Ea-ea*, *Ein*, *Eagg*);
- provést bakteriocinotypizaci u kolicinogenních kmenů *E. coli* (mikrociny, koliciny).

7 MATERIÁL

V praktické části byly provedeny u kmenů *E. coli* jednotlivé reakce PCR pro rozdělení do fylogenetických skupin, stanovení faktorů virulence a bakteriocinotypizaci. U vybraných kmenů byla analýza provedena i metodami triplex, multiplex a duplex PCR.

7.1 Přístrojová technika

- parní sterilizátor VARIOKLAV 75S, 135S (H+P Labortechnik, Německo)
- digitální váha - Kern&Sohn GmbH (Německo)
- termocykler PTC-200, MJ Research (Bio-Rad, USA)
- termocykler PTC-100, MJ Research (Bio-Rad, USA)
- termostat BT 120 (Laboratorní přístroje, Česká republika)
- elektroforetické zařízení – model D4 (OWL Separation System, Inc., Portsmouth, NH USA)
- UV-transiluminátor s dokumentačním zařízením, model In Genius (Syngene, UK)
- termoblok BIO, TDB-100 (Biotech, ČR)
- centrifuga - Minispin plus, eppendorf (Německo)
- automatické mikropipety (Nichiryo, Japonsko)
- Bio VORTEX V1 (Biotech, ČR)
- AEG-Electrolux – mikrovlnná trouba, model EMM 2005
- běžné laboratorní sklo

7.2 Kultivační média

Složení kultivačních médií je uvedeno v Tabulkách 4 a 5.

Masopeptonový agar (MPA)

Tab. 4. Složení MPA.

Surovina	Množství
Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	15 g
Masový výtažek (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	10 g
Pepton (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	10 g
NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)	5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Masopeptonový bujón (MPB)

Tab. 5. Složení MPB.

Surovina	Množství
Masový výtažek (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	3 g
Pepton (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	5 g
NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)	3 g
Destilovaná voda	1000 ml

7.3 Chemikálie

- TAQ DNA polymeráza - ThermoPol Buffer, New England, BioLabs, USA
- DyNAzyme F – 501L, Finnzymes
- PCR pufr - 10x ThermoPol Reaction Buffer, New England, BioLabs, USA
- DyNAzyme F – 501, 10x Buffer, Finnzymes
- 100 bp DNA Ladder, New England, BioLabs, USA
- dNTP Mix/12,5mM (mixture of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Jena Bioscience, Německo)
- MgCl₂
- Nanášecí pufr Lb 6x, TopBio, ČR

- Etidium bromid, Sigma Aldrich, Německo
- Primery (jednotlivé primery jsou uvedeny v tabulkách níže)
- TAE pufr (50x koncentrovaný)
- LE Agarose, SeaKem, Lonza, USA
- Sterilní destilovaná voda

7.4 Použité primery

Byly použity celkem tři typy primerů – pro stanovení fylogenetických skupin, pro určení faktorů virulence (1., 2. a 3. skupina) a pro bakteriocinotypizaci (koliciny a mikrocin).

7.4.1 Primery pro stanovení fylogenetických skupin

Tab. 6. Sekvence primerů pro fylogenetickou analýzu (upraveno) [77].

Primer	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost produktu (bp)
ChuA1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
ChuA2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
YjaA1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211
YjaA2	ATGGAGATTGCGTTCCTCACC	
TspE4C2.1	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152
TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

7.4.2 Primery pro stanovení faktorů virulence

Tab. 7. Primery 1. skupiny (upraveno) [78].

Primer	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost produktu (bp)
iss fp	ATCACATAGGATTCTGCCG	309
iss bp	CAGCGGAGTATAGATGCCA	
papC fp	GACGAACCAACGGTCAGGAT	501
papC bp	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
neuC fp	GGTGGTACATTCCGGGATGTC	670
neuC bp	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	
iucD fp	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	714
iucD bp	CCTGATCCAGATGATGCTC	

Pokračování Tab. 7.

tsh fp	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	824
tsh bp	CTTCCGATGTTCTGAACGT	
vat fp	TCCTGGGACATAATGGCTAG	981
vat bp	GTGTCAGAACGGAATTGTC	

Tab. 8. Primery 2. skupiny (upraveno) [78].

Primer	Sekvence primeru 5'-3'	Velikost produktu (bp)
VT1 fp	ACGTTACAGCGTGTTCRGGGATC	121
VT1 bp	TTGCCACAGACTGCGTCAGTRAGG	
VT2 fp	TGTGGCTGGTTCGTTAATACGGC	102
VT2 bp	TCCGTTGTCATGGAAACCGTTGTC	
ST I fp	TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG	160
ST I bp	GGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG	
ST II fp	CCCCCTCTCTTTTGCACCTTCTTTCC	423
ST II bp	TGCTCCAGCAGTACCATCTCTAACCC	
CNF 1 fp	GGCGACAAATGCAGTTTGCTTGG	552
CNF 1 bp	GACGTTGGTTGCGGTAATTTTGGG	
CNF 2 fp	GTGAGGCTCAACGAGATTATGCACTG	839
CNF 2 bp	CCACGCTTCTTCTTCAGTTGTTCCCTC	
LT I fp	TGGTTCATCATGCACCACAAGG	360
LT I bp	CCATTTCTCTTTTGCCTGCCATC	

Tab. 9. Primery 3. skupiny (upraveno) [79, 80].

Primer	Sekvence primeru 5'-3'	Velikost produktu (bp)
eaeA fp	TGAGCGGCTGGCATGAGTCATAC	241
eaeA bp	TCGATCCCCATCGTCACCAGAGG	
Env fp	TGGAAAACTCAGTGCCTCTGCGG	140
Env bp	TTCTGATGCCTGATGGACCAGGAG	
Eagg fp	AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC	194
Eagg bp	ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC	

7.4.3 Primery pro bakteriocinotypizaci

Tab. 10. Kolicinové primery (upraveno) [81].

Kolicin	Primer	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost produktu (bp)
A	ColA-F	CGTGGGGAAAAGTCATCATC	475
	ColA-R	GCTTTGCTCTTTCCTGATGC	
B	ColB-F	AAGAAAATGACGAGAAGACG	492
	ColB-R	GAAAGACCAAAGGCTATAAGG	
D	ColD-F	CTGGACTGCTGCTGGTGATA	420
	ColD-R	GAAGGTGCGCTTACTACTGC	
K	ColK-F	CAGAGGTCGCTGAACATGAA	469
	ColK-R	TCCGCTAAATCCTGAGCAAT	
L	Col28b-F	TGCATATTGAAAGCGTCAGC	449
	Col28b-R	CAGGTTATCCCCTCTCACCA	
M	ColM-F	GCTACCACTTCGCAAACC	429
	ColM-R	GAGCGACTCTCCGATAATGC	
N	ColN-F	AGCTTGGCGAGTATCTTGGA	401
	ColN-R	CAACACAGCCCCGAATAAAC	
U	ColU-F	TGATTGCTGCGAGAAAATG	485
	ColU-R	TCTGACAGCCTCTCCCTGTT	
E1	ColE1-F	TGTGGCATCGGGCGAGAATA	649
	ColE1-R	CTGCTTCTGAAAAGCCTTTT	
E2	ColE2-R	TGATGCTGCTGCAAAAGAG	409
	ColE2-R	TTCAAAGCGTTCCTACCAC	
E3	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	413
	ColE3-R	TCGGATTCGGACCTTTCAAC	
E4	ColE4-F	GAAGGCTGCATTTGATGCT	409
	ColE4-R	CGGATCCGGACCTTTAATTT	
E5	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	430
	ColE5-R	TTGAATTCTCGAATCGTCCA	
E6	ColE6-F	ACCGAACGTCCAGGTGTT	399
	ColE6-R	TTAGCCTGTCGCTCCTGAT	
E7	ColE7-F	GCATTCTGCCATCTGAAAT	431
	ColE7-R	CTTCTGCCACTTTCCTTCG	
E8	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	449
	ColE8-R	GACTGATTGGCTTGTCGTGA	
E9	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	418
	ColE9-R	GACTTTTCTCCCTCCGACCT	
Ia	ColIa-F	GCATGCAAATGACGCTCTTA	473
	ColIa-R	GAGGACGCCAGTTCTCTGTC	
Ib	ColIb-F	AACGAGTGGGTCGATGATTC	464
	ColIb-R	CCTTTTCTGCGCTCGTATTC	

Pokračování Tab. 10.

Y	ColY-F	GCAGGCAGAAAAGAACAAGG	477
	ColY-R	CGGACGTTATTTGCCTTCAT	
Js	ColJs-F	TCAAAATGTTTGGGCTCCTC	254
	ColJs-R	TAATCTGCCCTGTCCCACTG	
10	Col10-F	GGTTACCGGATTTCCCTGGAT	448
	Col10-R	TTCTGAATGCTTGGCCCACT	
S4	ColS4-F	TATATGGCCCAACTGCTGGT	456
	ColS4-R	CGTAAGGACGGACACCTGTT	
5	Col5-F	CATTGGCAAAGCGAAATTC	443
	Col5-R	TGCAACTCTGGAAACAATCG	

Tab. 11. Mikrocinové primery (upraveno) [81].

Mikrocin	Primer	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost produktu (bp)
J25	Mcc J25-F	TCAGCCATAGAAAGATATAGGTGTACCAAT	175
	Mcc J25-R	TGATTAAGCATTTCATTTTAATAAAGTGT	
B17	Mcc B17-F	TCACGCCAGTCTCCATTAGGTGTTGGCATT	135
	Mcc B17-R	TTCCGCCGCTGCCACCGTTTCCACCACTAC	
H47	Mcc H47-F	CACTTTCATCCCTTCGGATTG	227
	Mcc H47-R	AGCTGAAGTCGCTGGCGCACCTCC	
V	Mcc V-F	CACACACAAAACGGGAGCTGTT	680
	Mcc V-R	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	
C7	Mcc C7-F	CGTTCAACTGTTGCAATGCT	134
	Mcc C7-R	AGTTGAGGGGCGTGTAATTG	
L	Mcc L-F	GGTAAATGATATATGAGAGAAATAACGTTA	233
	Mcc L-R	TTTCGCTGAGTTGGAATTCCTGCTGCATC	
M	Mcc M-F	CGTTTATTATTTTATGAATA	456
	Mcc M-R	AAACGGAAGAATGGATGATCTCGCAA	
E492	Mcc E492-F	GTCTCTCCTGCACCAAAGC	291
	Mcc E492-R	TTTTCAGTCATGGCGTTCTG	

7.5 Příprava roztoků

100 bp DNA Ladder

- 180 µl H₂O
- 50 µl nanášecího pufru
- 20 µl DNA Ladder

TAE pufr 50x

- 20 Trizma 242 g
- 0,5M EDTA 100 ml
- Kyselina octová 57,1 ml
- Destilovaná voda doplnit do 1000 ml

TAE pufr 1x

- TAE pufr 50x 20 ml
- Destilovaná voda 980 ml

Nanášecí pufr LB 6x

- Bromfenolová modř 10 mg
- 0,5M EDTA 1,2 ml
- 10% SDS 600 µl
- Glycerol 1,2 ml
- Destilovaná voda doplnit do 10 ml

7.6 Použité bakteriální kmeny

Všechny kmeny *Escherichia coli*, použité v této práci (Tab. 12), pocházely ze sbírky mikroorganismů Fakulty technologické UTB ve Zlíně. Byly uchovávány zamražené při teplotách -20 °C a -80 °C a označeny kódem: 017, 059, 062, 064, 066, 087W - 099W, 101W - 107W, 109W – 127W; 222 – 230, 240, 241, 242, 247, 252, 255, 256, 257, 259, 260, 265, 266, 268, 271, 272, 273, 285.

Tab. 12. Seznam použitých kmenů *E. coli* [77, 82, 83, 84, 85]

Kmen	Datum zakoupení	Název vzorku, firma
017	2006	Kůže chlazeného kuřecího masa, zakoupeno v maloobchodní síti Zlín
059	2006	Kůže chlazeného kuřecího masa, zakoupeno v maloobchodní síti Zlín
062	2006	Kůže chlazeného kuřecího masa, zakoupeno v maloobchodní síti Zlín
064	2006	Kůže chlazeného kuřecího masa, zakoupeno v maloobchodní síti Zlín
066	2006	Kůže chlazeného kuřecího masa, zakoupeno v maloobchodní síti Zlín
087W	2006	Vepřový separát, Hamé Babice
088W	2006	Vepřový separát, Hamé Babice
089W	2006	Vepřový separát, Hamé Babice
090W	2006	Kůže chlazeného kuřecího masa, zakoupeno v obchodní síti Zlín
091W	2006	Kůže chlazeného kuřecího masa, zakoupeno v obchodní síti Zlín
092W	2006	Vepřový separát, Hamé Babice
093W	2006	Vepřový separát, Hamé Babice
094W	2006	Vepřový separát, Hamé Babice
095W	2006	Vepřový separát, Hamé Babice
096W	Srpen 2007	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
097W	Srpen 2007	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
098W	Srpen 2007	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
099W	2007	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
101W	2007	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
102W	2007	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
103W	2007	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
104W	2007	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
105W	2007	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
106W	2007	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
107W	2007	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
109W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
110W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
111W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
112W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
113W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
114W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
115W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
116W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod

<i>Pokračování Tab. 12.</i>		
117W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
118W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
119W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
120W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
121W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
122W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
123W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
124W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
125W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
126W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
127W	2009	Kuřecí kůže, Raciola Jehlička, Uherský Brod
222	Listopad 2010	Bažant, prsa, odběr 3. den po odlovu, z chovu
223	Listopad 2010	Bažant, stehno, odběr 3. den po odlovu, z chovu
224	Listopad 2010	Bažant, játra, odběr 3. den po odlovu, z chovu
225	Listopad 2010	Bažant, játra, odběr 3. den po odlovu, z chovu
226	Listopad 2010	Bažant, prsa, odběr 3. den po odlovu, z volné přírody
227	Listopad 2010	Bažant, játra, odběr 3. den po odlovu, z volné přírody
228	Listopad 2010	Bažant, játra, odběr 3. den po odlovu, z volné přírody
229	Listopad 2010	Bažant, prsa, odběr 12. den po odlovu, uskladněno venku ve visu, z chovu
230	Listopad 2010	Bažant, játra, odběr 12. den po odlovu, uskladněno venku ve visu, z chovu
240	2010	Maso, [85]
241	2010	Maso, [85]
242	2010	Maso, [85]
247	2010	Maso, [85]
252	2010	Maso, [85]
255	2010	Maso, [85]
256	2010	Maso, [85]
257	2010	Maso, [85]
259	2010	Maso, [85]
260	2010	Maso, [85]
265	2010	Maso, [85]
266	2010	Maso, [85]
268	2010	Maso, [85]
271	2010	Maso, [85]
272	2010	Maso, [85]
273	Listopad 2011	Vepřová plec, Ing. Vladimír Slušítk- Kašava 33, 763 19
285	Leden 2012	Kuřecí křídla, Raciola - Jehlička s.r.o.

8 METODY

8.1 Příprava vzorků DNA

Jednotlivé kmeny *E. coli* byly vyočkovány na živné půdy MPA křížovým roztěrem. Poté byly kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C, 24 hodin. Do předem připravených a označených ependorfeček bylo připraveno 100 µl 1x ředěného PCR pufru. Očkovací klíčkou byla kultura *E. coli*, narostlá na Petriho misce, přenesena do ependorfky s pufrem a suspenze byla homogenizována na vortexu. Suspenze v ependorfce byla následně vložena do termobloku, nastaveným na 95 °C, 20 minut. Po vyjmutí z termobloku byly vzorky vloženy do centrifugy na 60 sekund při 14.500 otáčkách. Supernatant byl poté odpipetován do nových ependorfeček a sloužil jako templát pro PCR reakce.

8.2 Příprava vzorků pro PCR

Jednotlivé komponenty reakční směsi byly připravovány ve formě master mixu, aby se předešlo nepřesnostem při pipetování a rovněž zkrácení času při přípravě vzorků. Celkový objem jedné reakční směsi činil 20 µl. Složení amplifikačních směsí pro PCR je uvedeno v příslušných podkapitolách níže.

8.2.1 Amplifikační směsi pro stanovení fylogenetických skupin

Stanovení fylogenetických skupin bylo provedeno dvěma metodami. První byla dle standardního protokolu, kdy do každé reakční směsi byla použita jedna pára primerů. Složení této amplifikační směsi je uvedeno v Tabulce 13. Dále byla použita metoda Triplex PCR, kdy do každé reakční směsi bylo přidáno MgCl₂ a všechny tři páry primerů. Složení amplifikační směsi dle metody Triplex PCR je uvedeno v Tabulce 14.

Tab.13. Složení směsi dle standardního protokolu (upraveno) [77].

Složka směsi pro PCR	Objem (µl)
Voda	16,2
PCR pufr	2,0
dNTP mix	0,4
TAQ DNA polymeráza	0,5
ChuA1/ChuA2	0,2/0,2
Templátová DNA	0,5

Tab.14. Složení směsi dle metody Triplex PCR (upraveno) [77].

Složka směsi pro PCR	Objem (μl)
Voda	12,5
PCR pufr	2,0
dNTP mix	0,4
MgCl ₂	0,4
ChuA1/ChuA2	0,1/0,1
YjaA1/YjaA2	0,1/0,1
TspE4C2.1/TspE4C2.2	0,1/0,1
TAQ DNA polymeráza	0,5

8.2.2 Amplifikační směsi pro stanovení faktorů virulence

Pro stanovení faktorů virulence bylo opět využito dvou metod – jednoduchou reakcí PCR a pomocí multiplex reakcí PCR. Jednotlivé komponenty byly smíchány ve formě master mixu za použití primerů 1. skupiny (Tabulka č. 7), primerů 2. skupiny (Tabulka č. 8) a primerů 3. skupiny (Tabulka č. 9). Složení amplifikační směsi pro jednoduchou reakci při použití primerů 1. skupiny je uvedeno v Tabulce 15, při použití primerů 2. skupiny v Tabulce 16, při použití primerů 3. skupiny v Tabulce 17 a pro multiplex reakci PCR v Tabulce 18.

Tab.15. Směs pro jednoduchou reakci PCR – primery 1. skupiny (upraveno) [78].

Složka směsi pro PCR	Objem (μl)
Voda	21,0
PCR pufr	2,5
dNTP mix	0,5
TAQ polymeráza	0,1
Primer F/R	0,25/0,25
Templátová DNA	0,5

Tab.16. Směs pro jednoduchou reakci PCR – primery 2. skupiny (upraveno) [78].

Složka směsi pro PCR	Objem (μl)
Voda	14,2
PCR pufr	2,4
dNTP mix	2,0
TAQ polymeráza	0,2
Primer F/R	0,3/0,3
Templátová DNA	2,0

Tab.17. Směs pro jednoduchou reakci PCR – primery 3. skupiny [79, 80].

Složka směsi pro PCR	Objem (μl)
Voda	16,0
PCR pufr	2,4
dNTP mix	1,0
TAQ polymeráza	0,2
Primer F/R	0,2/0,2
Templátová DNA	2,0

Tab.18. Směs pro multiplex reakci PCR – primery 1. a 2. skupiny (upraveno) [78].

Složka směsi pro PCR	Objem (μl)
Voda	16,0
PCR pufr	2,5
dNTP mix	1,0
TAQ polymeráza	0,5
Primer F/R	0,1/0,1
MgCl ₂	2,0
Templátová DNA	2,0

8.2.3 Amplifikační směsi pro bakteriocinotypizaci

Jednotlivé komponenty byly opět míchány ve formě master mixu. Použité kolicinové primery jsou uvedeny v Tabulce 10, mikrocinové primery jsou uvedeny v Tabulce 11. Množství jednotlivých složek, použitých pro jednoduchou PCR reakci, jsou uvedena v Tabulce 19.

Rovněž byla provedena duplex PCR, kdy byly páry primerů seřazeny do párů, což vedlo opět k úspoře materiálu i času pro přípravu. Použité rozřazení do párů je uvedeno v Tabulce 20, složení amplifikační směsi pro duplex PCR v Tabulce 21.

Tab.19. Složení směsi pro jednoduchou PCR (upraveno) [81].

Složka směsi pro PCR	Objem (μl)
Voda	21,0
PCR pufr	2,5
dNTP mix	0,5
TAQ polymeráza	0,1
Primer F/R	0,25/0,25
Templátová DNA	0,5

Tab.20. Rozřazení primerů do párů.

	Páry primerů (bp)
1	ColE2 (409) + ColIa (473)
2	ColD (420) + ColA (475)
3	ColE3 (413) + ColIb (464)
4	ColE4 (409) + ColS4 (456)
5	ColE6 (399) + Col5 (443)
6	ColE9 (418) + ColK (469)
7	ColM (429) + ColY (477)
8	ColN (401) + Col10 (448)
9	ColE5 (430) + ColU (485)
10	ColE7 (431) + ColB (492)
11	ColE8 (449) + ColE1 (649)
12	Col28b (449) + ColJs (254)
13	Mcc B17 (135) + Mcc H47 (227)
14	Mcc C7 (134) + Mcc E492 (291)
15	Mcc J25 (175) + Mcc M (456)
16	Mcc V (680) + Mcc L (233)

Tab.21. Složení směsi pro duplex reakci PCR (upraveno) [84].

Složka směsi pro PCR	Objem (μl)
Voda	20,4
PCR pufr	2,5
dNTP mix	0,5
TAQ polymeráza	0,1
Primer F ₁ /R ₁	0,25/0,25
Primer F ₂ /R ₂	0,25/0,25
Templátová DNA	0,5

8.3 Amplifikace PCR

Amplifikace byla prováděna v termocykleru za podmínek, které uvádí Tabulka 22. Pro stanovení faktorů virulence při použití primerů 3. skupiny byla amplifikace prováděna za podmínek, které uvádí Tabulka 23.

Tab.22. Podmínky PCR reakce.

Úvodní denaturace	94 °C/3 minuty
Denaturace	94 °C/30 sekund
Annealing	58 °C/30 sekund
Extenze	68 °C/3 minuty
Opakování cyklu	30 x
Závěrečná extenze	68 °C/3 minuty
Chlazení	4°C / ∞

Tab.23. Podmínky PCR reakce – faktory virulence, primery 3. skupiny [80].

Úvodní denaturace	95 °C/5 minut
Opakování cyklu 5 x	95 °C/30 sekund
	72°C/1 minuta
Denaturace	95 °C/ 30 sekund
Annealing	63 °C/30 sekund
Extenze	72 °C/30 sekund
Opakování cyklu	20 x
Závěrečná extenze	72 °C/5 minut
Chlazení	4°C / ∞

8.4 Detekce PCR produktů

K detekci produktů, získaných metodou PCR, byla použita elektroforéza v 1,5% agarózovém gelu. Gel byl připraven navážením 1,5 gramů agarózy a jejím rozpuštěním ve 100 ml 1x koncentrovaného TAE pufru, který byl předtím připraven zředěním z 50x koncentrovaného TAE pufru. Vzniklá směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě za občasného promíchávání, a nechala se projít 3x varem. Následně byl přidán etidiumbromid v množství 3 μ l a mírným zamícháním rozpuštěn. Poté byl roztok nalit do předem připravené elektroforetické vaničky s hřebínky a nechal se zatuhnout. K celému objemu 20 μ l PCR produktů byl přidán nanášecí pufr v množství 4 μ l. Po zatuhnutí byly vyjmuty hřebínky a gel byl přelit 1x koncentrovaným TAE pufrům. Do první jamky byl vždy nanesen jako standard 100 bp DNA marker, do následujících potom připravené vzorky. Elektroforetická separace poté probíhala při 90 V, 40 minut – dostatečně dlouho, aby bromfenolová modř, obsažená v nanášecím pufru, doputovala asi do 2/3 gelu. Po ukončení elektroforézy bylo provedeno vyhodnocení v UV světle pomocí transiluminátoru a výsledek byl zdokumentován pomocí programu Gene-Snap od Syngene.

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

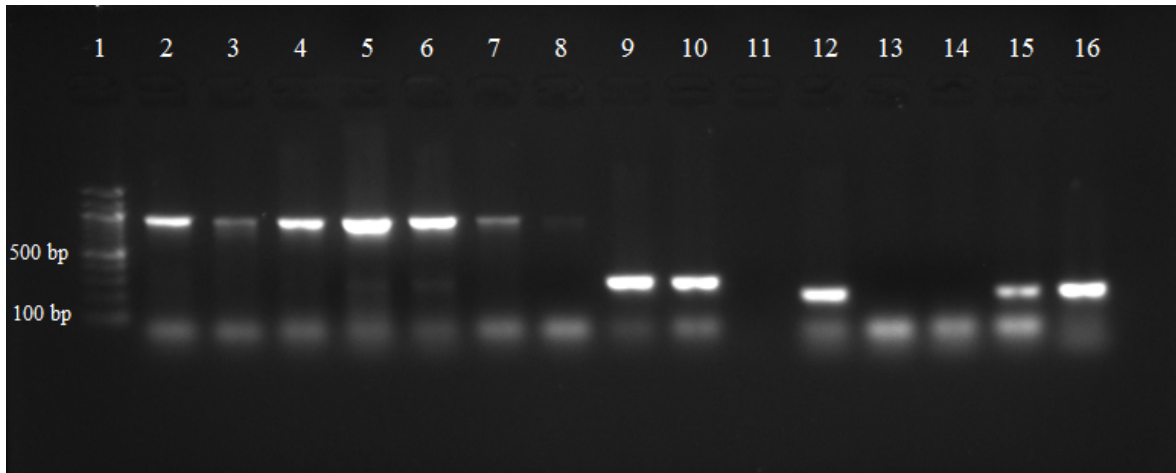
9.1 Fylogenetická analýza

V této práci byla k fylogenetické analýze použita metoda PCR dle standardního protokolu a metoda Triplex PCR. Metoda Triplex PCR byla popsána roku 2000 Clermontem a spol. a lze takto kmeny *E. coli* rozdělit do čtyř fylogenetických skupin – A, B1, B2 a D [56]. Analýza byla provedena u kmenů *E. coli* izolovaných z potravin a které byly již dříve ověřeny pomocí mikrotestů, že se skutečně jedná o *E. coli*. Po získání bakteriálních lyzátů a provedení PCR byla uskutečněna detekce produktů pomocí elektroforézy v agarózovém gelu a výsledky poté zdokumentovány pomocí programu SynGene Ingenius.

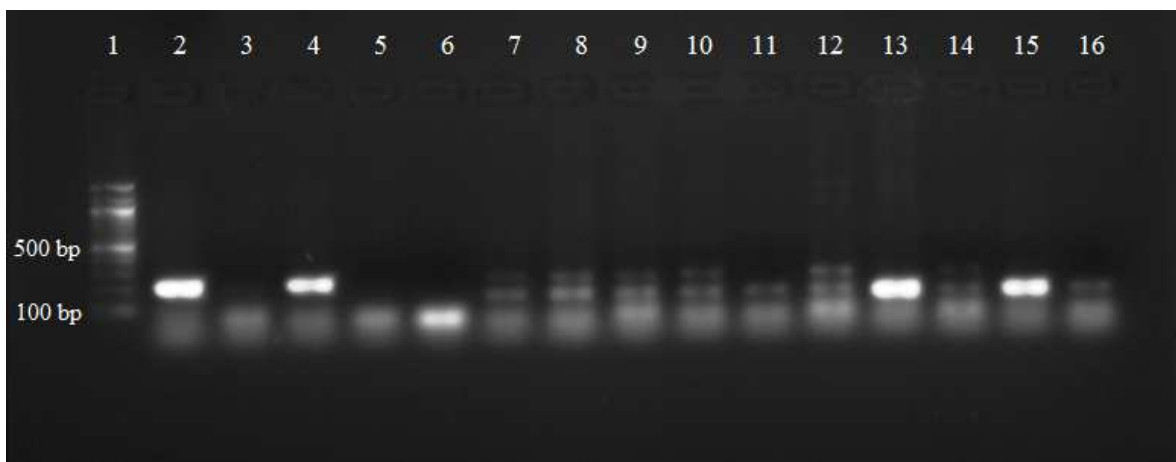
Vyšetřeno bylo celkem 55 kmenů. Při provedení PCR dle standardního protokolu byly u každého kmene uskutečněny 3 reakce. V případě použití metody Triplex se proces zjednodušil a stačila jediná reakce ke zjištění přítomných genů. Pakliže některý z výsledků u metody Triplex byl nejasný, byla pro ověření provedena PCR dle standardního protokolu.

9.1.1 Detekce produktů PCR reakce

Detekce produktů byla provedena pomocí elektroforézy v 1,5 % agarózovém gelu a výsledky byly vyhodnoceny v UV-transiluminátoru pomocí programu SynGene Ingenius. Jednalo se o metodu dle standardního protokolu, kde ke každé reakci byl použit pouze jeden pár primerů (Obr. 10, 11) a metodu Triplex se třemi páry primerů v jedné reakci. Detekovány byly 3 geny – *chuA* (279 bp), *yjaA* (211 bp) a fragment *TSPE4.C2* (152 bp). Pro rozlišení velikostí ampliconů byl použit 100 bp DNA marker.



Obr.10. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2.-8. jamka kmeny č. 089W, 092W, 093W, 096W, 097W, 101W, 103W – negativní geny *chuA*, nspecifický geny kolem 900-1000 bp; 9. a 10. jamka kmeny č. 105W, 106W – pozitivní geny *chuA* (279 bp); 12. jamka kmen č. 089W – pozitivní gen *yjaA* (211 bp); 13. a 14. jamka kmeny č. 092W, 093W – negativní geny *yjaA*; 15. a 16. jamka kmeny č. 096W, 097W – pozitivní geny *yjaA* (211 bp).



Obr.11. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2. jamka kmen č. 101W – pozitivní gen *yjaA* (211 bp); 3. jamka kmen č. 103W – negativní *yjaA*; 4. jamka kmen č. 105W – pozitivní gen *yjaA* (211 bp); 5. jamka kmen č. 106W – negativní gen *yjaA*; 6. jamka – kontrola; 7.-12. jamka kmeny č. 089W, 092W, 093W, 096W, 097W, 101W – negativní geny *TSPE4.C2*; 13. jamka kmen č. 103W – pozitivní gen *TSPE4.C2* (152 bp); 14. jamka kmen č. 105W – negativní gen *TSPE4.C2*.; 15. jamka kmen č. 106W – pozitivní gen *TSPE4.C2* (152 bp); 16. jamka – kontrola.

9.1.2 Vyhodnocení výsledků

Po provedení detekce produktů PCR reakce bylo provedeno rozdělení do jednotlivých fylogenetických skupin podle dichotomického klíče (Obr. 9), který navrhnul Clermont [56].

Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 24.

Tab.24. Výsledky fylogenetické analýzy.

Kmen	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4.C2</i>	Skupina
017	-	-	-	A
059	-	-	-	A
062	-	+	-	A
064	-	-	-	A
066	+	-	-	D
087W	-	-	-	A
088W	-	-	-	A
089W	-	+	-	A
090W	-	-	-	A
091W	+	+	-	B2
092W	-	-	-	A
093W	-	-	-	A
094W	-	-	+	B1
095W	-	-	-	A
096W	-	+	-	A
097W	-	+	-	A
098W	-	-	-	A
099W	-	-	-	A
101W	-	+	-	A
102W	-	+	-	A
103W	-	-	+	B1
104W	-	+	-	A
105W	+	+	-	B2
106W	+	-	+	D
107W	+	+	-	B2
109W	-	-	-	A
110W	-	-	-	A
111W	-	-	-	A
112W	-	-	-	A
113W	-	-	-	A
114W	-	-	-	A
115W	-	-	+	B1
116W	-	+	-	A
117W	-	+	-	A
118W	x	x	x	x

Pokračování Tab. 24.

119W	+	-	-	D
120W	-	+	-	A
121W	-	+	-	A
122W	+	-	+	D
123W	-	-	-	A
124W	x	x	x	x
125W	-	-	-	A
126W	-	-	-	A
127W	-	+	-	A
222	-	-	-	A
223	-	-	-	A
224	-	-	-	A
225	+	-	+	D
226	-	-	-	A
227	-	-	-	A
228	-	-	-	A
229	+	-	+	D
230	-	-	+	B1
273	+	+	+	B2
285	+	+	+	B2

Z celkových 55 kmenů, které byly podrobeny fylogenetické analýze, byla patřičná skupina přiřazena 53 z nich. Zbývající 2 kmeny vykazovaly negativní reakce na všechny způsoby detekce, včetně stanovení faktorů virulence. Jednalo se o kmeny č. 118 a 124. Z toho důvodu tedy byly podrobeny ještě analýze na detekci genu *lacZ*, kódující enzym β -galaktozidázu, která katalyzuje štěpení cukru laktózy. Pro jeho detekci bylo použito primerů LZL a LZR (264 bp) [86, 87]. Výsledky detekce byly negativní, proto by bylo vhodné opět provést identifikaci obou kmenů, zda-li se skutečně jedná o kmeny *E. coli*.

Z ostatních 53 kmenů *E. coli* podrobených fylogenetické analýze bylo 38 kmenů zařazeno do skupiny A (72 %), 4 kmeny do skupiny B1 (8 %), 5 kmenů do skupiny B2 (9 %) a 6 kmenů do skupiny D (11 %). Ve fylogenetické skupině A a B1 se obvykle nachází méně virulentní komenzální kmeny, kdežto ve fylogenetické skupině B2 a D naopak virulentní extraintestinální kmeny [54, 55]. Celkem 6 kmenů, získaných z vepřových separátů, bylo zařazeno do skupiny A a jeden kmen do skupiny B1. Kmen č. 273, získaný z vepřové plece, byl zařazen do skupiny B2 a jedná se tedy o virulentní extraintestinální kmen. Obdobně byl do skupiny B2 zařazen i kmen č. 285 získaný z kuřecích křídel. Další testované kmeny

pocházely z kuřecí kůže. Celkem 26 kmenů zde bylo zařazeno do skupiny A a 2 kmeny do skupiny B1. Mezi virulentní extraintestinální kmeny bylo zařazeno 7 kmenů, z toho 3 kmeny do skupiny B2 a 4 kmeny do skupiny D. Poslední testovanou skupinou byly kmeny získané z bažantů. Jednalo se o celkem 9 kmenů, z toho 7 kmenů bylo zařazeno do skupiny A a B1 – tedy mezi komenzální kmeny. Dva kmeny byly zařazeny do skupiny D mezi virulentní extraintestinální kmeny, jednalo se o kmeny č. 225 a 229, oba získané z bažantů z chovů.

Rovněž Tomášová [77] se ve své práci zabývala rozřazením některých kmenů *E. coli* do příslušných fylogenetických skupin. Společně s touto prací se tak jedná již o soubor 108 testovaných kmenů *E. coli* náležejících do sbírky mikroorganismů Fakulty technologické UTB ve Zlíně. Celkem 64 kmenů (59 %) bylo zařazeno do skupiny A, 30 kmenů (28 %) do skupiny B1, 8 kmenů (7 %) do skupiny B2 a 6 kmenů (6 %) do skupiny D [77].

Ze získaných výsledků je tedy zřejmé, že velká část kmenů *E. coli*, nacházejících se v potravinách, se řadí právě mezi nepatogenní komenzální kmeny. Byl ovšem potvrzen výskyt rovněž virulentních extraintestinálních kmenů *E. coli*, i když v malém množství a je možné, že jejich přítomnost značí sekundární kontaminaci fekálního původu.

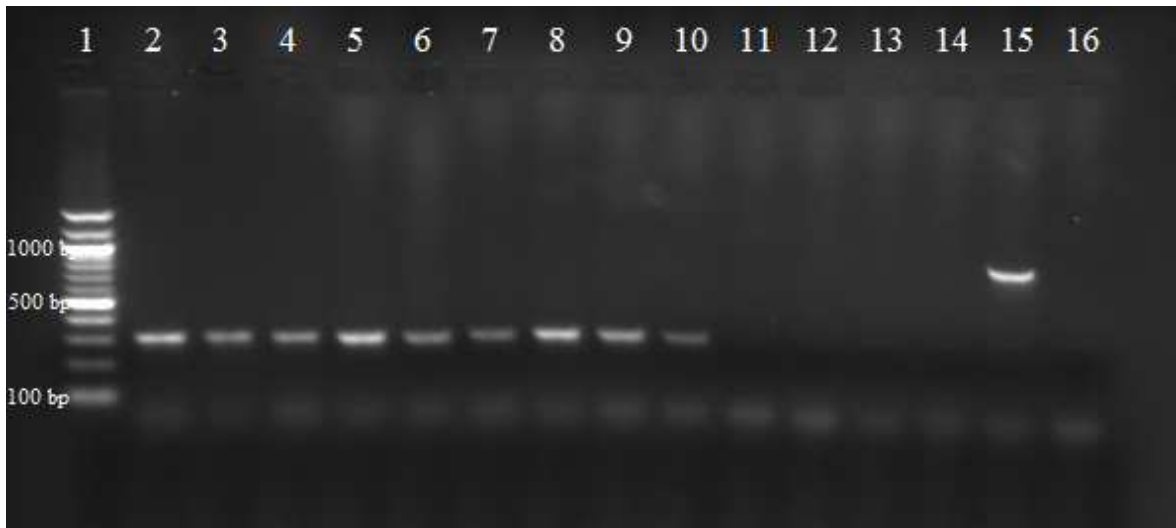
Zůstává otázkou, jak přesná však metoda dle Clermonta je s ohledem na nedávno provedenou studii, kterou uskutečnil M. Doumith a spol. Bylo zjištěno, že se kmeny mnohdy nesprávně zařazují na základě nepřítomnosti všech tří genů do skupiny A [57]. Z toho důvodu by tedy bylo vhodné výsledky ještě ověřit přesnější metodou, jakou je například multilokusová enzymová elektroforéza.

9.2 Detekce faktorů virulence

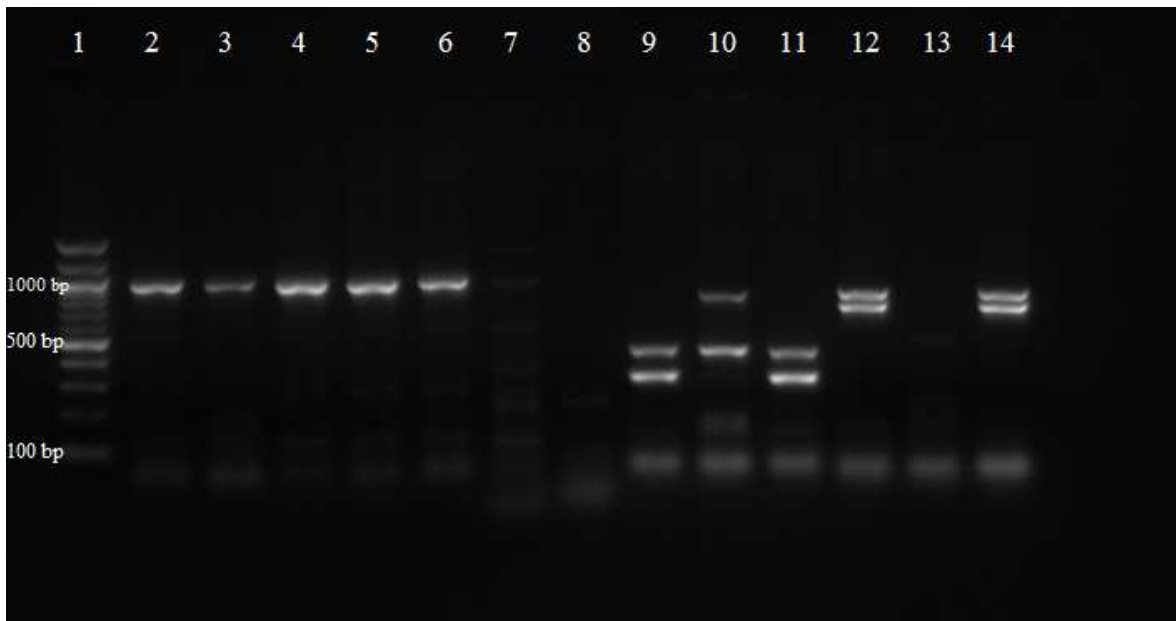
Bakterie *E. coli* jsou přirozenou součástí střevního traktu teplo-krevných živočichů, včetně lidí. Mnoho kmenů je komenzálního typu, kdy hostiteli neškodí, naopak mohou být i prospěšné (*E. coli* Nissle 1917) [70]. Je však známo i velké množství patogenních kmenů, které mohou vyvolávat řadu onemocnění – intestinálních či extraintestinálních [61]. *E. coli* je nositelem různých typů faktorů virulence, které mají vliv při rozvoji onemocnění. Mezi tyto nejvýznamnější faktory je možné zařadit například adhesiny, invasiny či toxiny. Všechny tyto faktory se poté zapojují do složitých mechanismů, které ovlivňují míru patogenity daného kmene *E. coli* [10, 60].

9.2.1 Detekce produktů PCR reakce

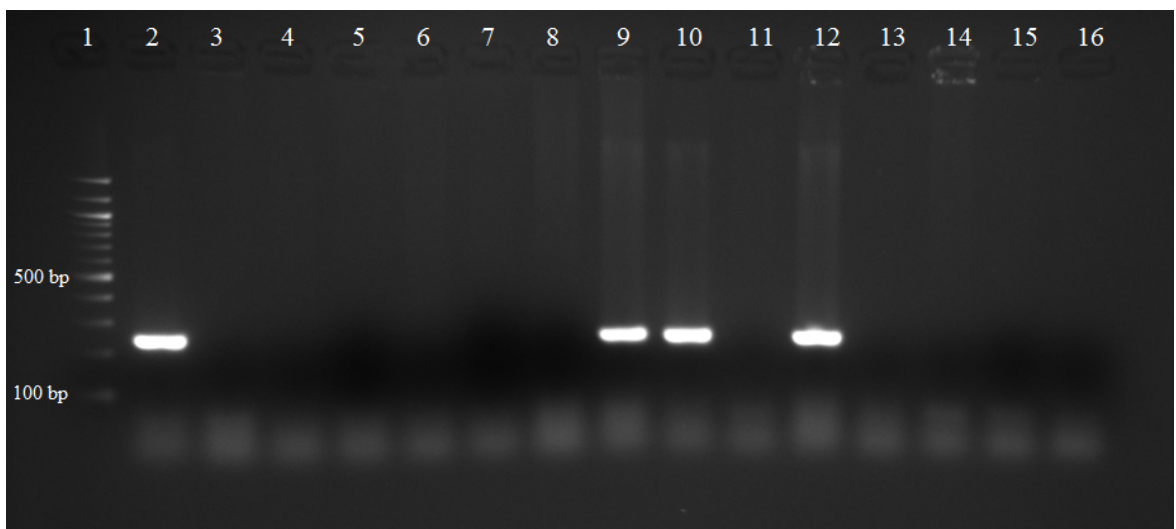
Detekce produktů PCR reakce byla provedena obdobně, jako při fylogenetické analýze. Opět byly využity dva způsoby – jednoduchou reakcí PCR (Obr. 12), kde byl použit jeden pár primerů a metodou multiplex se třemi páry primerů (Obr. 13). Na Obrázku 14 poté byla zachycena detekce primerů 3. skupiny.



Obr.12. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2.-10. jamka kmeny č. 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230 – pozitivní geny iss (309 bp); 11. jamka kontrola; 12.-14. jamka kmeny č. 222, 223, 224 – negativní geny na tsh; 15. jamka kmen č. 225 – pozitivní gen na tsh (824 bp); 16. jamka vzorek č. 226 – negativní gen tsh.



Obr.13. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2.-6. jamka kmeny č. 087W, 084W, 095W, 096W, 097W – negativní geny *chuA*, nespecifické geny kolem 900-1000 bp; 7. a 8. jamka kmeny č. 087W a 094W – negativní geny *yjaA*; 9. jamka kmen č. 103W – pozitivní geny *iss* (309 bp) a *papC* (501 bp), negativní gen *neuC*; 10. jamka kmen č. 105W – pozitivní gen *papC* (501 bp), negativní geny *iss* a *neuC*, nespecifický gen kolem 950 bp; 11. jamka kmen č. 106W – pozitivní geny *iss* (309 bp) a *papC* (501 bp), negativní gen *neuC*; 12. jamka kmen č. 103W – pozitivní geny *tsh* (824 bp) a *vat* (981 bp), negativní gen *iucD*; 13. jamka kmen č. 105W – negativní geny *iucD*, *tsh* a *vat*; 14. jamka kmen č. 106W – pozitivní geny *tsh* (824 bp) a *vat* (981 bp), negativní gen *iucD*.



Obr.14. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2. jamka kmenč. 017 – pozitivní gen *eaeA* (241 bp); 3.-8. jamka kmeny č. 059, 062, 064, 066, 091W,

103W – negativní geny na *eaeA*; 9. a 10. jamka kmeny č. 104W, 105W – pozitivní geny na *eaeA* (241 bp); 11. jamka kmen č. 106W – negativní gen *eaeA*; 12. jamka kmen č. 107W – pozitivní gen *eaeA* (241 bp); 13.-16. jamka kmeny č. 119W, 122W, 225, 226 – negativní geny *eaeA*.

9.2.2 Vyhodnocení výsledků

Po provedení detekce byly výsledky zahrnuty do tabulek – detekce genů pro faktory virulence 1. skupiny - *iss*, *papC*, *neuC*, *iucD*, *tsh*, *vat* (Tab. 25) a detekce genů pro faktory virulence 3. skupiny – *eaeA*, *Einv*, *Eagg* (Tab. 26). Výsledky detekce genů pro faktory virulence 2. skupiny – *VT1*, *VT2*, *ST1*, *ST2*, *CNF1*, *CNF2*, *LT1*, do tabulky zpracovány nebyly s ohledem na nepřítomnost pozitivního výsledku.

Tab.25. Faktory virulence – primery 1. skupiny.

Kmen	<i>iss</i>	<i>papC</i>	<i>neuC</i>	<i>iucD</i>	<i>tsh</i>	<i>vat</i>
017	-	-	-	-	-	-
059	+	-	-	+	+	-
062	-	-	-	-	-	-
064	-	-	-	+	-	-
066	-	-	-	+	-	-
087W	-	-	-	-	-	-
088W	+	-	-	-	-	-
089W	-	-	-	-	-	-
090W	+	-	-	-	-	-
091W	+	-	-	+	-	-
092W	-	-	-	-	-	-
093W	-	-	-	-	-	-
094W	-	-	-	-	-	-
095W	-	-	-	-	-	-
096W	-	-	-	+	-	-
097W	-	-	-	-	-	-
098W	+	-	-	-	-	-
099W	-	-	-	-	-	-
101W	-	-	-	+	-	-
102W	-	-	-	+	-	-
103W	+	+	-	-	+	+
104W	-	-	-	-	-	-
105W	-	+	-	-	-	-
106W	+	+	-	-	+	+
107W	-	-	-	-	-	-

<i>Pokračování Tab. 25.</i>						
109W	-	-	-	-	-	-
110W	-	-	-	-	-	-
111W	-	-	-	-	-	-
112W	-	-	-	-	-	-
113W	-	-	-	-	-	-
114W	-	-	-	-	-	-
115W	+	-	-	+	-	-
116W	-	-	-	+	-	-
117W	-	-	-	+	-	-
118W	x	x	x	x	x	x
119W	-	-	-	-	-	-
120W	+	-	-	+	-	-
121W	+	-	-	+	-	-
122W	+	-	-	-	-	-
123W	-	-	+	+	-	-
124W	x	x	x	x	x	x
125W	-	-	-	-	-	-
126W	-	-	-	-	-	-
127W	-	-	-	-	-	-
222	+	-	-	-	-	-
223	+	-	-	-	-	-
224	+	-	-	+	-	-
225	+	-	-	+	+	-
226	+	-	-	+	-	-
227	+	-	-	+	-	-
228	+	-	-	+	-	-
229	+	-	-	+	+	-
230	+	-	-	+	-	-
240	-	-	-	-	+	-
241	-	-	-	-	+	-
242	-	-	-	+	-	-
247	-	-	-	-	+	-
252	-	-	-	-	+	-
255	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-	-
257	-	-	-	-	+	-
259	-	-	-	-	+	-
260	-	-	-	-	-	-
265	-	-	-	-	+	-
266	-	-	-	-	+	-
268	-	-	-	+	+	-
271	-	-	-	-	+	-
272	-	-	-	-	-	-

Pokračování Tab. 25.						
273	-	-	-	+	+	-
285	-	-	-	+	+	-

Tab.26. Faktory virulence – primery 3. skupiny.

Kmen	eaeA	Einv	Eagg
017	+	-	-
059	-	-	-
062	-	-	-
064	-	-	-
066	-	-	-
091W	-	-	-
103W	-	-	-
104W	+	-	-
105W	+	-	-
106W	-	-	-
107W	+	-	-
119W	-	-	-
122W	-	-	-
225	-	-	-
226	-	-	-
229	-	-	-
230	-	-	-
273	-	-	-
285	-	-	-

Celkem bylo analýze s primery 1. skupiny podrobena 70 kmenů *E. coli*. Výsledky byly získány u 68 z nich, kdy kmeny č. 118 a 124, obdobně jako u fylogenetické analýzy, nereagovaly a bylo by vhodné pomocí mikrotestů ověřit, zda-li skutečně jde o kmeny *E. coli*. Ze 68 kmenů bylo na geny *iss* pozitivních 20 (29 %), *papC* 3 (4 %), *neuC* 1 (1 %), *iucD* 24 (35 %), *tsh* 17 (25 %) a *vat* 2 (3 %).

- Gen *iss* – jedná se o gen, který kóduje sérovou bílkovinu přežití a zlepšuje tak ochranu daného kmene *E. coli*. Výskyt genu byl zaznamenán u UPEC i NMEC kmenů. Ve velké míře se nachází na plazmidu ColV, které se běžně vyskytují u APEC kmenů [88]. Gen byl v této práci detekován u 20 z 68 kmenů, z toho 10 kmenů bylo získáno z kuřecích kůží a 9 kmenů bylo izolováno z bažantů. Ze získaných výsledků je zřejmé, že přítomnost genu *iss* může poukazovat na aviární původ a napovídat o patogenitě.

- Gen *papC* – gen je možné zařadit k faktorům virulence podílejících se na adhezenci pomocí adhesinů na hostitelskou buňku. Gen *papC* se nachází především u UPEC kmenů *E. coli*. Tyto kmeny jsou vybaveny tzv. P-fimbriemi, pomocí nichž se uskutečňuje adherence k hostitelské buňce [10, 89]. Gen *papC* byl detekován pouze u 3 kmenů z 68, ve všech případech byl izolován z kuřecích kůží. Může se tedy jednat o UPEC kmeny *E. coli*, což nevyklučuje ani přítomnost genů *iss* nacházejících se u dvou těchto kmenů.
- Gen *neuC* – gen *neuC* je potřebný pro syntézu kyseliny sialové a podílí se tak na tvorbě i transportu kapsle K1. Biosyntéza i transport jsou zakódovány v 17kb klastru genu KPS. Často se tento gen vyskytuje u NMEC kmenů *E. coli* [90]. V této práci byl pozitivní pouze jeden kmen č. 123 izolovaný z kuřecí kůže a pravděpodobně se může jednat právě o NMEC kmen *E. coli*.
- Gen *iucD* – protein, který se nachází na plazmidu ColV-K30. Součástí je hned 5 genů; *iucA,B,C,D*, které se účastní syntézy aerobaktinu a *iutA*, který kóduje vnější membránový receptor pro železo - feri-aerobaktinový komplex. *IucD* zastává dvě hlavní funkce: katalyzuje unikátní typ reakce N⁶-okysličení lyzinu a rovněž zprostředkovává první krok biosyntézy aerobaktinu [91]. V této práci bylo na přítomnost genu detekováno celkem 24 kmenů *E. coli*, z toho 15 kmenů bylo izolováno z kuřecích kůží a 7 kmenů z bažantů.
- Gen *tsh* – jedná se o gen řadící se mezi autotransportní proteiny. Nachází se na plazmidu ColV a je citlivý na teploty hemaglutininu. Často se nachází u UPEC a APEC kmenů *E. coli* [92]. Podílí se na adhezenci i na produkci cytotoxinů [93]. Pozitivních kmenů na gen *tsh* bylo 17, přičemž se jednalo o izoláty z kuřat, bažantů, krůt a vepřových nožiček. Je tedy pravděpodobné, že většina kmenů se bude řadit právě mezi aviárně patogenní kmeny *E. coli*, případně kmeny UPEC.
- Gen *vat* – kóduje autotrasportní cytotoxin, kódován je na ostrůvku patogenity PAI. Často se nachází u aviárních patogenních kmenů *E. coli* [94]. Pozitivní na gen *vat* byly pouze 2 kmeny – 103 a 106. Kmeny byly izolovány z kuřat, přičemž oba byly pozitivní i na geny *tsh*, *papC* a *iss*, které se často vyskytují u kmenů APEC a lze proto předpokládat, že tyto dva kmeny náležejí do této skupiny patogenních kmenů *E. coli*.

Detekcí faktorů virulence, při použití primerů 2. skupiny, se ve své diplomové práci zabývala rovněž Knechtlová M., přičemž pro analýzu rovněž použila některé kmeny *E. coli* ze sbírky mikroorganismů Fakulty technologické UTB ve Zlíně. Společně s touto prací tak již bylo otestováno celkem 108 kmenů *E. coli*. Na gen *iss* bylo pozitivních celkem 37 kmenů (34 %), na přítomnost genu *papC* 6 kmenů (6 %), pro gen *neuC* 1 kmen, na gen *iucD* 42 kmenů (39%), pro gen *tsh* 27 kmenů (25 %) a na gen *vat* byly pozitivní 3 kmeny. Z výsledků je patrná častá společná přítomnost genů *iss* a *iucD* [78]. Obzvláště je možné si této skutečnosti povšimnout u kmenů izolovaných z bažantů, kde všech 9 kmenů bylo pozitivních na gen *iss* a 7 z nich na přítomnost genu *iucD*. Společný výskyt těchto dvou genů byl zjištěn rovněž u jiných kmenů získaných z kuřecích kůží, z čehož je možné usoudit, že přítomnost obou genů v rámci jednoho kmene je poměrně běžným jevem.

Pro přítomnost genů při použití primerů 2. skupiny bylo analýze podrobena celkem 44 kmenů *E. coli*. Ani u jednoho kmene však nebyla prokázána přítomnost některého z těchto genů. ETEC mohou produkovat dva typy toxinů - termolabilní LT (*LT1*) a termostabilní ST (*ST1*, *ST2*). Genetická informace pro tvorbu těchto enterotoxinů je vázána na plazmidech [61, 62]. U kmenů VTEC je známa produkce verotoxinů. V této práci byly stanovovány verotoxiny *VT1* a *VT2*. [62, 63]. Kmeny UPEC naopak často produkují cytotoxické, nekrotizující toxiny, označované jako *CNF1* a *CNF2* [95, 96].

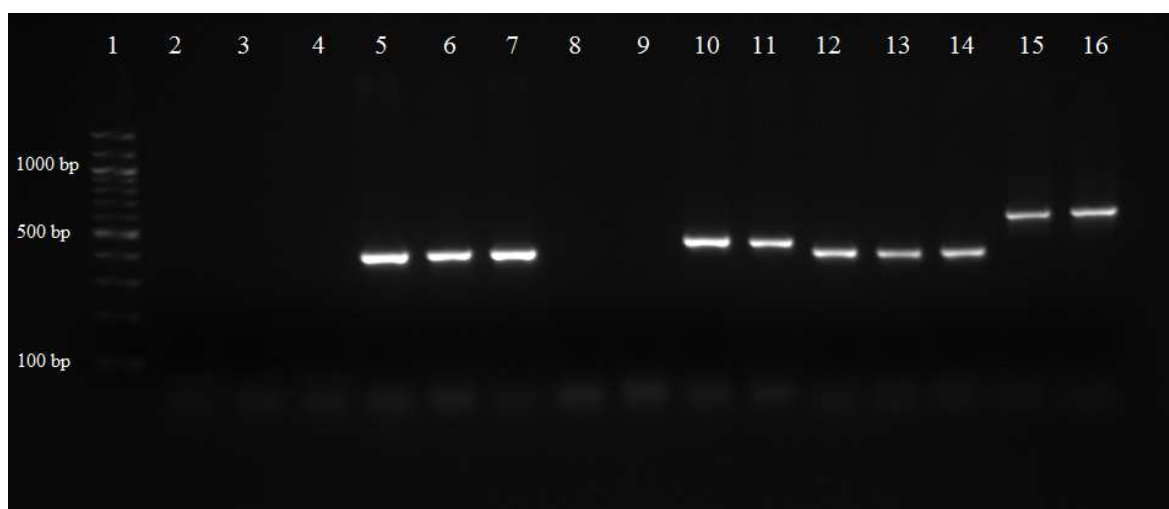
U celkem 19 kmenů *E. coli* byla provedena analýza na přítomnost genů *eaeA*, *Einv* a *Eagg*. Pozitivní výsledky byly pouze pro gen *eaeA*, kde z 19 kmenů byl gen detekován u 4 z nich. Geny *Einv* a *Eagg* nebyly detekovány. Gen *eaeA* kóduje intimin - membránový protein, který je nutný pro připojení na epitelární buňky. Často bývá součástí u kmenů EPEC i EHEC [97]. *Einv* je gen zodpovědný za kódování enteroinvazních mechanismů a gen *Eagg* za kódování enteroagregativních mechanismů [98].

9.3 Detekce produkce bakteriocinů

Bakteriociny tvoří různorodou skupinu ribozomálně syntetizovaných antimikrobiálních peptidů [67]. Je možné je dělit na dvě skupiny - koliciny a mikrocinů [68]. V této práci byly bakteriociny detekovány celkem u 18 kmenů *E. coli*, přičemž bylo stanovováno celkem 8 mikrocinů a 24 kolicinů.

9.3.1 Detekce produktů PCR reakce

Detekce proběhla opět obdobně, jako při fylogenetické analýze. Byly použity dvě metody detekce amplikonů – jednoduchá reakce s použitím jednoho páru primerů a metody duplex PCR (Obr. 15), kdy jednotlivé páry primerů byly seřazeny do párů, což vedlo k úspoře materiálu i času pro přípravu. Rozřazení do párů je uvedeno v Tabulce 19.



Obr.15. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2.-4. jamka kmeny č. 117W, 120W, 121W – negativní geny E5 a U; 5.-7. jamka kmeny č. 112W, 113W, 114W – pozitivní gen E7 (431 bp), negativní gen B; 8. a 9. jamka kmeny č. 116W a 117W – negativní geny na E7 a B; 10. a 11. jamka kmeny č. 120W a 121W – pozitivní geny B (492 bp), negativní geny E7; 12.-14. jamka kmeny č. 112W, 113W, 114W – pozitivní geny E8 (449 bp), negativní geny E1; 15. a 16. jamka kmeny č. 116W a 117W- pozitivní geny E1 (649 bp), negativní geny E8.

Pokračování Tab. 28.								
120W	-	-	-	-	-	-	-	-
121W	-	-	-	-	-	-	-	-
273	-	-	-	-	-	-	-	-
285	-	-	-	-	-	-	-	-

Produkce mikrocinů byla z 18 kmenů *E. coli*, podrobených analýze, prokázána pouze u dvou z nich, konkrétně u kmenů č. 273 a 285. V obou případech se jednalo o mikrocin V. Ten obsahuje jednu SS vazbu mezi Cys76 a Cys87 a působí na membrány bakteriálních buněk, kdy indukuje tvorbu iontových kanálů a to vede narušení proton-hybné síly a rovněž produkce ATP [99].

Rovněž byla provedena detekce na produkci celkem 24 různých kolicinů. Analýza byla uskutečněna opět u 18 kolicinogenních kmenů *E. coli*, přičemž u každého kmene byla detekována produkce vždy alespoň jednoho z kolicinů. Z 18 kmenů bylo pozitivních na produkci kolicinů E2 - 1 kmen, U - 1 kmen, Ia - 1 kmen, Ib - 3 kmeny, Y - 3 kmeny, B - 4 kmeny, M - 4 kmeny, E1 - 5 kmenů, E7 - 8 kmenů, E8 - 11 kmenů. Naopak negativní byla produkce kolicinů A, D, K, L, N, Js, 5, 10, S4, E3, E4, E5, E6 a E9.

Produkce pouze jednoho bakteriocinu byla zaznamenána u 3 kmenů, produkce dvou bakteriocinů u 8 kmenů, produkce tří bakteriocinů u 5 kmenů, produkce čtyř bakteriocinů u 1 kmene a produkce 5 různých bakteriocinů u 1 kmene. Na produkci dvou a více bakteriocinů bylo pozitivních celkem 15 kmenů *E. coli* (83 %). Ze získaných výsledků lze vyvodit, že vícenásobná produkce bakteriocinů u jednoho kmene, je zcela běžným jevem, což potvrzují i jiné studie. Gordon a O'Brien analyzovali celkem 102 kmenů na produkci bakteriocinů, přičemž 42 % kmenů produkovalo pouze 1 bakteriocin, 41 % kmenů - 2 bakteriociny, 16 % kmenů - 3 bakteriociny a 1 kmen produkoval celkem 4 různé bakteriociny [100]. Vícenásobná produkce bakteriocinů dává daným kmenům jistou výhodu v širším spektru působení na jiné kmeny, než kmeny, které produkují pouze jeden bakteriocin a tím se zvyšují jejich šance zvítězit v konkurenčním boji, který mezi sebou jednotlivé bakterie vedou.

Významné je rovněž vyšší zastoupení kmenů *E. coli*, které produkují kolicin E1. V této práci byl detekován u 5 kmenů. Produkce tohoto kolicinu bývá často zaznamenávána u uropatogenních kmenů *E. coli*, které způsobují infekci močových cest [68]. Vysoké zastoupení bylo detekováno i u kolicinů E7 a E8. Oba koliciny působí primárně vůči DNA, kterou poškozují - jak plazmidovou, tak i chromozomální [101]. Kolicin M je zodpovědný

za inhibici syntézy peptidoglykanu, a principem účinku kolicinů E1, B, Ia, Ib a U je tvorba pórů v cytoplazmatické membráně [102].

V různých studiích je možné si rovněž povšimnout současného výskytu dvou různých bakteriocinů u jednoho kmene. Týká se to například mikrocinu H47 a kolicinu M, kolicinu Ia a mikrocinu V, kolicinů E1 a M, kolicinů E1 a Ia a rovněž kolicinů B a M, čehož si lze dobře povšimnout i v této práci u kmenů č. 120W, 121W, 273 a 275. Tyto dva koliciny se řadí mezi jedny z nejčastěji produkováných u *E. coli*. Současného výskytu dvou bakteriocinů si lze povšimnout i u kmenů 087W, 088W, 098W, 109W, 110W, 112W, 113W a 114W, kde vedle sebe byly detekovány bakteriociny E7 a E8. Současný výskyt dvou bakteriocinů je často dán jejich kódováním poblíž, či vedle sebe na jednom plazmidu [100, 103].

Na bakteriocinotypizaci kolicinogenních kmenů *E. coli* ze sbírky mikroorganismů Fakulty technologické UTB ve Zlíně pracovaly i Miková K. a Krejčířiková T. Společně s touto prací tak již byla provedena analýza na produkci bakteriocinů celkem u 51 kmenů. Celkově bylo pozitivních na produkci bakteriocinů *mccV* – 16 kmenů, *mccL* – 1 kmen, *mccC7* – 4 kmeny, *mccB17* – 4 kmeny, *mccM* – 2 kmeny, B – 14 kmenů, M – 15 kmenů, U – 1 kmen, Y – 7 kmenů, Ia – 16 kmenů, Ib – 11 kmenů, E1 – 10 kmenů, E2 – 4 kmeny, E5 – 2 kmeny, E6 – 2 kmeny, E9 – 1 kmen, E7 – 14 kmenů a E8 – 16 kmenů. Na produkci dvou a více bakteriocinů bylo pozitivních celkem 38 kmenů *E. coli* (75 %). Na tomto souboru 51 kmenů bylo skutečně prokázáno, že je vícenásobná produkce bakteriocinů zcela běžným jevem. Rovněž je zde ještě lépe patrná současná produkce 2 různých bakteriocinů, konkrétně kolicinů B – M a E7 – E8 [84, 104].

ZÁVĚR

Bakterie *Escherichi coli* je běžně vyskytujícím se mikroorganizmem v zažívacím traktu zvířat i lidí. Je důležitá pro spávný průběh procesu trávení. Mnoho kmenů je však patogeních a může vyvolávat za určitých podmínek řadu onemocnění. Z toho důvodu je často středem vědeckých studií, které se snaží tuto bakterii co nejlépe charakterizovat a prozkoumat co nejvíce jejích vlastností. Významné je její rozdělování do fylogenetických skupin, stanovení faktorů virulence a rovněž i možnosti bakteriocinotypizace.

Fylogenetická analýza byla v této práci provedena celkem u 55 kmenů *E. coli*, které pocházely z různých druhů potravin. Výsledky byly získány u 53 kmenů. Největší podíl kmenů byl zařazen do fylogenetické skupiny A – celkem 38 kmenů (72 %), 6 kmenů do skupiny D (11 %), 5 kmenů do skupiny B2 a 4 kmeny do fylogenetické skupiny B1 (8 %). Většinu těchto kmenů je tedy možné zařadit mezi méně virulentní, komenzální kmeny *E. coli*. I přes tuto skutečnost je však zřejmé, že už samotný výskyt *E. coli* v potravině naznačuje nedostatečnou hygienu při manipulaci s potravinou, či ne příliš efektivní sanitaci prostor i ploch.

Na stanovení faktorů virulence bylo analýze podrobeno celkem 70 kmenů *E. coli*, přičemž výsledky byly získány u 68 z nich. Pro 23 kmenů (34 %) nebyl detekován žádný faktor virulence, u 26 kmenů (38 %) byl stanoven jeden faktor virulence a u 19 kmenů (28 %) byly detekovány 2 a více různých faktorů virulence. Často byla zaznamenána kombinace genů *iss* a *iucD*, případně genu *tsh*. Tyto geny se často vyskytují u aviárně patogenních kmenů *E. coli* a lze tak usuzovat, že značná část kmenů se řadí právě do této skupiny.

Bakteriocinotypizace byla provedena u 18 kmenů *E. coli*. Stanovení byla provedena na produkci kolicinů i mikrocinů. Produkce pouze jednoho bakteriocinu byla zaznamenána u 3 kmenů (17 %), u zbylých 18 kmenů (83 %) byla detekována produkce 2 a více různých bakteriocinů. Nejčastěji byla detekována přítomnost genů na produkci kolicinů B, M, Y, Ib, E1 a E7. Dále byla zaznamenána i přítomnost genů pro kolicin U, Ia a E2. Pro produkci mikrocinů byly pozitivní poze 2 kmeny *E. coli* a jednalo se o *mccV*.

Ze sbírky mikroorganismů Fakulty technologické UTB ve Zlíně bylo fylogenetické analýze podrobeno již celkem 108 kmenů *E. coli*. Celkem 64 kmenů (59 %) bylo zařazeno do skupiny A, 30 kmenů (28 %) do skupiny B1, 8 kmenů (7 %) do skupiny B2 a 6 kmenů (6 %) do skupiny D, z čehož vyplývá, že většina kmenů *E. coli* vyskytujících se v potravinách

se řadí mezi nepatogenní komenzální kmeny. Analýze faktorů virulence pro geny *iss*, *papC*, *neuC*, *iucD*, *tsh* a *vat* bylo už podrobeno rovněž 108 kmenů *E. coli*. Na gen *iss* bylo pozitivních 37 kmenů (34 %), na gen *papC* 6 kmenů (6 %), gen *neuC* 1 kmen, gen *iucD* 42 kmenů (39 %), gen *tsh* 27 kmenů (25 %) a na gen *vat* byly pozitivní 3 kmeny. Z výsledků je patrná častá společná přítomnost genů *iss* a *iucD*, obzvláště u kmenů izolovaných z bažantů a kuřecích kůží, a lze tak předpokládat, že většina z nich se bude řadit mezi APEC kmeny. Bakteriocinotypizace byla provedena u souboru 51 kmenů. Na produkci dvou a více bakteriocinů bylo pozitivních hned 38 kmenů *E. coli* (75 %), z čehož je zřejmé, že vícenásobná produkce bakteriocinů je zcela běžným jevem a přináší to daným kmenům značnou výhodu v konkurenčním boji mezi sebou.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SHULMAN, S. T., FRIEDMANN, H. C., SIMS, R. H. Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician?. *Clinical Infectious Diseases*. 2007-10-15, roč. 45, č. 8, s. 1025-1029. ISSN 1058-4838. DOI: 10.1086/521946. Dostupné z: <<http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/521946>>
- [2] SEDLÁČEK, I. *Escherichia a Shigella – pro klinickou bakteriologii dva dlouho známé rody, přesto taxonomicky stále problematické. Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie*. 2011, roč. 20, č. 3, s. 100-103. Dostupné z: <http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/20_2011/03_brezen/100_escherichia.pdf>
- [3] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 978-802-0017-031.
- [4] LEDERBERG, J., CAVALLI, L. L., LEDERBERG, E. M. Sex compatibility in *Escherichia coli*. *Department of Genetics, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, and Istituto Sicroterapico Milanese " Serafino Belfanti," Milano, Italia*. 1952, s. 720-730. Dostupné z : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1209583/pdf/720.pdf>>
- [5] NCBI – *Escherichia* [online], [cit. 2013-3-22]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=561>>
- [6] *Escherichia coli* [online], [cit. 2013-3-22]. Dostupný z WWW: <http://www.niaid.nih.gov/SiteCollectionImages/topics/biodefenserelated/e_coli.jpg>
- [7] SUSSMAN, M. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. New York: Cambridge University Press, 1997, xvi, 639 p., [1] p. of plates. ISBN 05-214-5361-5.
- [8] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
- [9] WANG, L., ROTHEMUND, D., CURD, H., REEVES, P. R. Species-Wide Variation in the *Escherichia coli* Flagellin (H-Antigen) Gene. *Journal of Bacteriology*. 2003, roč. 185, č. 9, DOI: 10.1128/JB.185.9.2936-2943.2003

- [10] BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. Slovníky spisovatelů. ISBN 80-238-0297-6.
- [11] YURA, T., MORI, H., NAGAI, H., NAGATA, T., ISHIHAMA, A., FUJITA, N., ISONO, K., MIZOBUCHI, K., NAKATA, A. Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 0 to 2.4 min region. *Nucleic Acids Research*. 1992, roč. 20, č. 13, s. 3305-3308. ISSN 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/20.13.3305. Dostupné z: <<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/20.13.3305>>
- [12] ADAMS, M., MOSS, M. *Food microbiology: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 3rd ed. Cambridge, UK: RSC Publishing, c2008, xiv, 463 p. Slovníky spisovatelů. ISBN 08-540-4284-9.
- [13] ZBOŘIL, V., MOSS, M. *Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti*. 1. vyd. Praha: Grada, 2005, 153 s. Slovníky spisovatelů. ISBN 80-247-0584-2.
- [14] RILEY, M. A., WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*. 2002, roč. 56, s. 117-137.
- [15] Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli* dle TNV 75 7835 [online], [cit. 2013-3-26]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/document.php?docId=8575>>
- [16] m-FC Agar [online], [cit. 2013-3-26]. Dostupný z WWW: <<http://www.grainger.com/Grainger/EMD-mFC-Agar-Membrane-Filter-Fecal-Coliform-9LGJ8>>
- [17] Koliformní bakterie, fekální koliformní bakterie a *Escherichia coli* jako mikrobiologické ukazatele jakosti vody [online], [cit. 2013-3-26]. Dostupný z WWW: <<http://www.mzp.cz/ris/ais-ris-info-copy.nsf/6d13b004071d0140c12569e700154acb/59c2db2383e078ac802567f000308e79?OpenDocument>>
- [18] Mikrobiologická kontrola vod – základní platné právní předpisy [online], [cit. 2013-3-26]. Dostupný z WWW: <<http://ovz.ic.cz/vysmet/kontrolavody.pdf>>
- [19] Lactose TTC Agar with Tergitol 7 [online], [cit. 2013-3-26]. Dostupný z WWW: <<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFA AF6AA849816B2EF5285946FF25011AA>>

- [20] TBX Chromogenní agar [online], [cit. 2013-3-26]. Dostupný z WWW: <lm.biovendor.cz/download.php?file=S...pdf&_full_path=1>
- [21] TBX Chromo Agar for detection of *E.coli* in food samples [online], [cit. 2013-3-26]. Dostupný z WWW: <<http://www.fiers.be/nl/life-science/microbiology/chromogenic-agar/tbx-chromo-agar-for-detection-of-ecoli-in-food-samples>>
- [22] BD MacConkey Agar with Sorbitol [online], [cit. 2013-3-27]. Dostupný z WWW: <<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=25388>>
- [23] BD Endo Agar [online], [cit. 2013-3-27]. Dostupný z WWW: <<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8583>>
- [24] Endo Agar, HiMedia Laboratories [online], [cit. 2013-3-27]. Dostupný z WWW: <<http://himedialabs.com/TD/M029.pdf>>
- [25] EC Broth, Biokar diagnostic [online], [cit. 2013-3-27]. Dostupný z WWW: <[http://www.biokar-diagnostics.com/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/4F6D4BB6091347E7C12574C80036DB96/\\$file/TDS_BK162_v6.pdf](http://www.biokar-diagnostics.com/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/4F6D4BB6091347E7C12574C80036DB96/$file/TDS_BK162_v6.pdf)>
- [26] ENTEROtest 24 N, Erba Lachema [online], [cit. 2013-3-27]. Dostupný z WWW: <<https://www.erbalachema.com/attachments/ENTEROtest%2024N-CZ+SK+EN+RU+PL.pdf>>
- [27] Občanské sdružení Ve škole i mimo ni. 117. Bakterie IV. - Gramovo barvení a imerzní mikroskopie - kultivované bakterie. *Praktický průvodce mikrosvětem I.* 2010, s. 1-3. Dostupné z: <<http://mikrosvet.mimoni.cz/>>
- [28] Stručný teoretický úvod do molekulární genetiky a jejích metod [online], [cit. 2013-3-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.gyn-test.cz/testy-uvod-do-molekularni-genetiky/>>
- [29] Southern Blotting [online], [cit. 2013-3-30]. Dostupný z WWW: <<http://askabiologist.asu.edu/southern-blotting>>
- [30] BROWN. T. A. *Southern Blotting and Related DNA Detection Techniques*. Encyclopedia of Life Sciences. University of Manchester Institute of Science and Technology, Manchester, UK. 2001

- [31] PCR (polymerázová řetězová reakce) [online], [cit. 2013-3-30]. Dostupný z WWW: <http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-pcr&lang=cz>
- [32] MULLIS. K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, April 1990, s. 56-65.
- [33] SAIKI, R., D. GELFAND, S. STOFFEL, S. SCHARF, R. HIGUCHI, G. HORN, K. MULLIS a H. ERLICH. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988-01-29, roč. 239, č. 4839, s. 487-491. ISSN 0036-8075. DOI: 10.1126/science.2448875. Dostupné z: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2448875>>
- [34] LAWYER, F., STOFFEL, S., SAIKI, K. R., CHANG, S., LANDRE, A. P., ABRAMSON, D. R., GELFAND, H. D. High-level Expression, Purification, and Enzymatic Characterization of Full-length *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and a Truncated Form Deficient in 5' to 3' Exonuclease Activity. *PCR Methods and Applications*. 1993, 2:275-287, ISSN 1054-9803/93
- [35] Nobelovy ceny 1993 [online], [cit. 2013-3-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.vesmir.cz/clanek/nobelovy-ceny-1993>>
- [36] PCR dNTP mix [online], [cit. 2013-3-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.top-bio.cz/dalsi-material-pro-pcr-21.html?pcr-dntp-mix>>
- [37] Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) [online], [cit. 2013-3-30]. Dostupný z WWW: <<http://biologie.upol.cz/metody/Amplifikace%20pomoci%20PCR.htm>>
- [38] ROSYPAL, S. a kol. *Úvod do molekulární biologie, díl čtvrtý*. 3. vyd. Brno. 2002, 300 s. ISBN 80-902562-4-4.
- [39] Buffer [online], [cit. 2013-3-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.pcrlinks.com/glossary/B.htm>>
- [40] Why Is Magnesium Chloride Used in PCR? [online], [cit. 2013-3-30]. Dostupný z WWW: <http://www.ehow.com/about_5390976_magnesium-chloride-used-pcr.html>

- [41] GARIBYAN, L., AVASHIA, N. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, roč. 133, č. 3, e6-. ISSN 0022-202x. DOI: 10.1038/jid.2013.1. Dostupné z: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/jid.2013.1>>
- [42] Principle of the PCR [online], [cit. 2013-3-31]. Dostupný z WWW: <<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>
- [43] Molekuly na povel IV [online], [cit. 2013-3-31]. Dostupný z WWW: <<http://www.vesmir.cz/clanek/molekuly-na-povel-iv>>
- [44] LAVICKÁ, E., KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z. Vyhledávání polymorfizmů v genu MYF6 pomocí automatického sekvencování DNA. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Dostupné z WWW: <<http://mnet.mendelu.cz/mendelnet2006/articles/bioziv/lavicka.pdf>>
- [45] LOFFERT, D., KARGER, S., TWIELING, G., ULBER, V., KANG, J. Optimization of multiplex PCR. *Giagen News*. 1999, č. 2.
- [46] WEN, D., ZHANG, CH. Universal Multiplex PCR: a novel method of simultaneous amplification of multiple DNA fragments. *Plant Methods*. 2012, roč. 8, č. 1, s. 32-. ISSN 1746-4811. DOI: 10.1186/1746-4811-8-32. Dostupné z: <<http://www.plantmethods.com/content/8/1/32>>
- [47] PAVLÍK, E. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku – část 3. Univerzita Karlova a Oddělení molekulárně biologické diagnostiky Ústavu biochemie a patobiochemie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Dostupné z: <<http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>>
- [48] Real-time PCR [online], [cit. 2013-4-1]. Dostupný z WWW: <<http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>>
- [49] ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno, 2005, ISBN 80-210-3841-1.
- [50] Horizontální elektroforéza [online], [cit. 2013-3-27]. Dostupný z WWW: <<http://www.multilab.sk/horizontalna-elektroforeza/>>

- [51] Čipové technologie v genetickém testování [online], [cit. 2013-3-28]. Dostupný z WWW: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/cipove-technologie-v-geneticke-testovani-146702>>
- [52] BEKAL, S., R. BROUSSEAU, L. MASSON, G. PREFONTAINE, J. FAIRBROTHER a J. HAREL. Rapid Identification of *Escherichia coli* Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays. *Journal of Clinical Microbiology*. roč. 41, č. 5, s. 2113-2125. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.41.5.2113-2125.2003. Dostupné z: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.41.5.2113-2125.2003>>
- [53] GORDON, D. M., CLERMONT, O., TOLLEY, H., DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*. 2008, roč.10, č. 10, s. 2484-2496.
- [54] BASHIR, S., HAQUE, A., SARWAR, Y., ALI, A., ANWAR, M. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2012, roč. 11, č. 1, s. 23-. ISSN 1476-0711. DOI: 10.1186/1476-0711-11-23. Dostupné z: <<http://www.ann-clinmicrob.com/content/11/1/23>>
- [55] CHOI, Ui-Y., HAN, S. B., LEE, S. Y., KANG, J. H., KIM, S. M., MA, S. H. Regional differences in phylogenetic group of *Escherichia coli* strains isolated from children with urinary tract infection in Korea. *Korean Journal of Pediatrics*. 2012, roč. 55, č. 11, s. 420-. ISSN 1738-1061. DOI: 10.3345/kjp.2012.55.11.420. Dostupné z: <<http://synapse.koreamed.org/DOIX.php?id=10.3345/kjp.2012.55.11.420>>
- [56] CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, roč. 66, č. 10, s. 4555-4558.
- [57] DOUMITH, M., M. J. DAY, R. HOPE, J. WAIN a N. WOODFORD. Improved Multiplex PCR Strategy for Rapid Assignment of the Four Major *Escherichia coli* Phylogenetic Groups. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012-08-15, roč. 50, č. 9, s. 3108-3110. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.01468-12. Dostupné z: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01468-12>>

- [58] KRAMÁŘ, R. Lékařská mikrobiologie obecná. Vztahy makro a mikroorganismu. [online], [cit. 2013-4-08]. Dostupné z: <http://www.eamos.cz/amos/kvz/externi/kvz_444/makromikro.htm>
- [59] Avirulence [online], [cit. 2013-4-08]. Dostupný z WWW: <<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/avirulence>>
- [60] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-868-5000-5.
- [61] *Escherichia coli* [online], [cit. 2013-4-08]. Dostupný z WWW: <http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/escherichia_coli.php#etec>
- [62] SCHINDLER, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 223 s., [24] s. příl. ISBN 978-802-4731-704.
- [63] STEC – Shiga-like toxigenní *Escherichia coli* [online], [cit. 2013-4-08]. Dostupný z WWW: <<http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/ec/index.html>>
- [64] TEPLAN, Vladimír. *Infekce ledvin a močových cest: v dospělém a dětském věku*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004, 252 s. ISBN 80-247-0566-4.
- [65] DUBOIS, D., PRASADARAO, N. V., MITTAL, R., BRET, L., ROUJOU-GRIS, M., BONNET, R. CTX-M $\hat{\text{P}}$ -Lactamase Production and Virulence of *Escherichia coli* K1. *Emerging Infectious Diseases*. 2009, roč. 15, č. 12, s. 1988-1990. ISSN 1080-6040. DOI: 10.3201/eid1512.090928.
- [66] MANGIAMELE, P., B. NICHOLSON, Y. WANNEMUEHLER, T. SEEMANN, C. M. LOGUE, G. LI, K. A. TIVENDALE a L. K. NOLAN. Complete Genome Sequence of the Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain APEC O78. *Genome Announcements*. 2013-02-28, roč. 1, č. 2, e00026-13-e00026-13. ISSN 2169-8287. DOI: 10.1128/genomeA.00026-13.
- [67] DOBSON, A., COTTER, P. D., ROSS, R. P., HILL, C. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait?. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011-12-16, roč. 78, č. 1, s. 1-6. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.05576-11. Dostupné z: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.05576-11>>
- [68] ŠMAJS, D., MICENKOVÁ, L., ŠMARDA, J., VRBA, M., ŠEVČÍKOVÁ, A., VALIŠOVÁ, Z., WOZNICOVÁ, V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic

- and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiology*. 2010, 10:288. ISSN 1471-2180. DOI: 10.1186/1471-2180-10-288.
- [69] ŠMAJS, D., ČEJKOVÁ, D., MICENKOVÁ, L., LIMA-BITTENCOURT, C. I., CHARTONE-SOUZA, E., ŠMARDA, J., NASCIMENTO, A. M. A. Human *Escherichia coli* strains of different geographical and time source: bacteriocin types and their gene sequences are population-specific. *Environmental Microbiology Reports*. 2012, roč. 4, č. 4, s. 459-466. ISSN 17582229. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2012.00365.x.
- [70] Probiotické kmeny a druhy [online], [cit. 2013-4-09]. Dostupný z WWW: <<http://www.zdravastreva.cz/page/68192.probioticke-kmeny-a-druhy/>>
- [71] CASCALES, E., S. K. BUCHANAN, D. DUCHE, C. KLEANTHOS, R. LLOUBES, K. POSTLE, M. RILEY, S. SLATIN a D. CAVARD. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007-03-08, roč. 71, č. 1, s. 158-229. ISSN 1092-2172. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06. Dostupné z: <<http://mibr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00036-06>>
- [72] GRATIA, J. P. André Gratia: A Forerunner in Microbial and Viral Genetics. *Genetics*. 2000, roč. 156, č. 2, s. 471-476. PMCID: PMC1461273
- [73] Colicins (Molecular Biology) [online], [cit. 2013-4-09]. Dostupný z WWW: <<http://what-when-how.com/molecular-biology/colicins-molecular-biology/>>
- [74] ZSCHUTTIG, A., ZIMMERMANN, K., BLOM, J., GOESMANN, A., POHLMANN, CH., GUNZER, F., BERESWILL, S. Identification and Characterization of Microcin S, a New Antibacterial Peptide Produced by Probiotic *Escherichia coli* G3/10. *PLoS ONE*. 2012-3-30, roč. 7, č. 3, e33351-. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0033351. Dostupné z: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033351>>
- [75] DRIDER, D., REBUFFAT, S. *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. New York: Springer Verlag, c2011, xiii, 451 p. ISBN 14-419-7692-2.
- [76] PONS, A-M., LANNELUC, I., COTTENCEAU, G., SABLE. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie*. 2002, roč. 84, 5-6, s. 531-

537. ISSN 03009084. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01416-5. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908402014165>>
- [77] TOMÁŠOVÁ, Z. Rozdělení kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin do fylogenetických skupin. Diplomová práce. 2012, Technologická fakulta UTB ve Zlíně. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [78] KNECHTLOVÁ, M. Detekce faktorů virulence u kmenů *Escherichia coli* metodou PCR. Diplomová práce. 2012, Technologická fakulta UTB ve Zlíně. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [79] HOLKO, I., BISOVA, T., HOLKOVA, Z., KMET, V. Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. *Food Control*. 2006, roč. 17, č. 5, s. 393-396. ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.01.007. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713505000368>>
- [80] PASS, A. M., ODEDRA, R., BATT, M. R. Multiplex PCRs for Identification of *Escherichia coli* Virulence Genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, roč. 38, č. 5, s. 2001-2004.
- [81] JANÁKOVÁ, L. Optimalizace multiplex PCR pro současnou detekci kolicinů a mikrocinů. Diplomová práce. 2010, Technologická fakulta UTB ve Zlíně. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [82] MOLATOVÁ, Z. Bezpečnost potravin živočišného původu – Mikrobiologická analýza povrchu drůbežního masa a následná dekontaminace. Diplomová práce. 2006, Technologická fakulta UTB ve Zlíně. Vedoucí diplomové práce Pavel Březina.
- [83] ŠTEKLOVÁ, V. Antimikrobiální účinek kyseliny kaprylové na mikroflóru chlazené drůbeže. Diplomová práce. 2006, Technologická fakulta UTB ve Zlíně. Vedoucí diplomové práce Eva Lukášková.
- [84] MIKOVÁ, K. Bakteriocinotypizace kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin. Diplomová práce. 2011, Technologická fakulta UTB ve Zlíně. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [85] ROZUMKOVÁ, J. Výskyt antibiotické rezistence u kmenů *E. coli* izolovaných z potravin. Diplomová práce. 2010, Technologická fakulta UTB ve Zlíně. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.

- [86] LOST, I., DREYFUS, M. The stability of *Escherichia coli* lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *The Embo Journal*. 1995, roč. 14, č. 13, s. 3252-3261.
- [87] BEJ, A. K., MAHBUBANI, H. M., DICESARE, L. J., ATLAS, M. R. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991, roč. 57, č. 12, s. 3529-3534.
- [88] JOHNSON, J. T., WANNEMUEHLER, M. Y., NOLAN, K. L. Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, roč. 74, č. 8, s. 2360-2369.
- [89] DODSON, W. K., DUBUISSON, J. F., STRIKER, T. R., HULTGREN, J. S. Outer-membrane PapC molecular usher discriminately recognizes periplasmic chaperone-pilus subunit complexes. *Proceedings of the National Academy of sciences*. 1993, roč. 90, s. 3670-3674.
- [90] VANN, W. F., D. A. DAINES, A. S. MURKIN, M. E. TANNER, D. O. CHAFFIN, C. E. RUBENS, J. VIONNET a R. P. SILVER. The NeuC Protein of *Escherichia coli* K1 Is a UDP N-Acetylglucosamine 2-Epimerase. *Journal of Bacteriology*. roč. 186, č. 3, s. 706-712. ISSN 0021-9193. DOI: 10.1128/JB.186.3.706-712.2004. Dostupné z: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.186.3.706-712.2004>>
- [91] HERRERO, M., LORENZO, V., NEILANDS, JB. Nucleotide sequence of the *iucD* of the Volv-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with *phoA* and *LacZ* gene fusions. *Journal of Bacteriology*. 1988 roč. 170, č. 1, s. 56-61.
- [92] TSH – temperature-sensitive hemagglutinin [online], [cit. 2013-4-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.wikigenes.org/e/gene/e/3853553.html>>
- [93] DOZOIS, CH. M., DHO-MOULIN, M., BREÉ, A., FAIRBROTHER, J. M., DE SAUTE, C. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun*. 2000, roč. 68, č. 7, s.4145–4154.
- [94] PARREIRA, V. R., C. L. GYLES, A. S. MURKIN, M. E. TANNER, D. O. CHAFFIN, C. E. RUBENS, J. VIONNET a R. P. SILVER. A Novel Pathogenicity Island Integrated Adjacent to the *thrW* tRNA Gene of Avian Pathogenic *Escherichia*

- coli* Encodes a Vacuolating Autotransporter Toxin. *Infection and Immunity*. roč. 71, č. 9, s. 5087-5096. ISSN 0019-9567. DOI: 10.1128/IAI.71.9.5087-5096.2003. Dostupné z: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.71.9.5087-5096.2003>>
- [95] RIPPERE-LAMPE, E. K., O'BRIEN, D. A., CONRAN, R., LOCKMAN, A. H. Mutation of the Gene Encoding Cytotoxic Necrotizing Factor Type 1 (*cnf1*) Attenuates the virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 2001, roč. 69, č. 6, s. 3954-3964.
- [96] OSWALD, E., SUGAI, M., LABIGNE, A., WU, C. H., FIORENTINI, C., BOQUET, P., O'BRIEN, D. O. Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994, roč. 91, č. 9, s. 3814-3818.
- [97] LOUIE, M., AZAVEDO, C. J., HANDELSMAN, Y. M., CLARK, G. C., ALLY, B., DYTOC, M., SHERMAN, P., BRUNTON, J. Expression and characterization of the *eaeA* gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infection and Immunity*. 1993, roč. 61, č. 10, s. 4085-4092.
- [98] MURPHY, J., M.L. DEVANE, B. ROBSON, B.J. GILPIN, D. O. CHAFFIN, C. E. RUBENS, J. VIONNET a R. P. SILVER. Genotypic characterization of bacteria cultured from duck faeces. *Journal of Applied Microbiology*. roč. 99, č. 2, s. 301-309. ISSN 1364-5072. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02590.x. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2005.02590.x>>
- [99] Microcin V [online], [cit. 2013-4-13]. Dostupný z WWW: <http://www.bio-world.com/productinfo/2_35_848/129270/Microcin-V-MccV-old-name-Colicin-V-ColV-class-a-microcins-bacteriocins-Gram-negative-bacteria-BBMm.html>
- [100] GORDON, D. M., O'BRIEN, C. L.. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2006, roč. 152, č. 11, s. 3239-3244. ISSN 1350-0872. DOI: 10.1099/mic.0.28690-0. Dostupné z: <<http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.28690-0>>
- [101] ŠMARDA, J., ŠMARDA, J. Jr, VRBICKÁ, Z. Colicins E7 and E8 degrade DNA in sensitive bacteria. *Folia Microbiologica*. 1990, roč. 35, č. 4, s. 348-352.
- [102] ABRAHAM, S., CHIN, J., BROUWERS, H. J. M., TURNER, B., ZHANG, R., CHAPMAN, T. A.. Green Fluorescent Protein-Based Biosensor To Detect and

Quantify Stress Responses Induced by DNA-Degrading Colicins. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, roč. 77, č. 18, s. 6691-6693. ISSN 0099-2240.

DOI:10.1128/AEM.00534-11. Dostupné z:

<<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00534-11>>

- [103] CHRISTENSON, J. K., GORDON, D. M., BROUWERS, H. J. M., TURNER, B., ZHANG, R. , CHAPMAN, T. A. Evolution of colicin BM plasmids: the loss of the colicin B activity gene. *Microbiology*. roč. 155, č. 5, s. 1645-1655. ISSN 1350-0872. DOI: 10.1099/mic.0.026666-0. Dostupné z:

<<http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.026666-0>>

- [104] KŘEJČIŘÍKOVÁ, T. Výskyt kolicinogenie u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin. Bakalářská práce. 2008, Technologická fakulta UTB ve Zlíně. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PCR	Polymerázová řetězová reakce
TBX	Trypton bile X-glucuronid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
TTC	Triphenyl-tetrazolium chlorid
RT-PCR	Reverzní PCR
UM-PCR	Univerzální Multiplex PCR
UPEC	Uropatogenní <i>E. coli</i>
MLST	Multilokusová enzymovou elektroforéza
ETEC	Enterotoxická <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropatogenní <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvazní <i>E. coli</i>
EAEC	Enteroadherentní <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohemoragická <i>E. coli</i>
STEC	Shiga-like toxigenní <i>E. coli</i>
VTEC	Verotoxigenní <i>E. coli</i>
HUS	Hemolyticko-uremický syndrom
IMC	Infekce močových cest
NMEC	Neonatal Meningitis <i>Escherichia coli</i>
APEC	Aviární patogenní <i>E. coli</i>
MPA	Masopeptonový agar
MPB	Masopeptonový bujón
UTB	Univerzita Tomáše Bati

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Theodor Escherich [1].....</i>	12
<i>Obr. 2. Escherichia coli (upraveno) [6].....</i>	14
<i>Obr. 3. m-FC Agar [16].....</i>	15
<i>Obr. 4. TTC agar s laktózou a Tergitolem [19].....</i>	16
<i>Obr.5. TBX chromogenní agar [21].....</i>	17
<i>Obr. 6. Průběh PCR [31].....</i>	21
<i>Obr. 7. Exponenciální amplifikace [42].....</i>	22
<i>Obr.8. Elektroforetická vanička [50].....</i>	24
<i>Obr.9. Dichotomický rozhodovací strom pro stanovení fylogenetické skupiny u E. coli [56].....</i>	27
<i>Obr.10. Obr.10. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2.-8. jamka kmeny č. 089W, 092W, 093W, 096W, 097W, 101W, 103W – negativní geny chuA, nespecifický geny kolem 900-1000 bp; 9. a 10. jamka kmeny č. 105W, 106W – pozitivní geny chuA (279 bp); 12. jamka kmen č. 089W – pozitivní gen yjaA (211 bp); 13. a 14. jamka kmeny č. 092W, 093W – negativní geny yjaA; 15. a 16. Jamka kmeny č. 096W, 097W – pozitivní geny yjaA (211 bp).....</i>	54
<i>Obr.11. Obr.11. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2. jamka kmen č. 101W – pozitivní gen yjaA (211 bp); 3. jamka kmen č. 103W – negativní yjaA; 4. jamka kmen č. 105W – pozitivní gen yjaA (211 bp); 5. jamka kmen č. 106W – negativní gen yjaA; 6. jamka – kontrola; 7.-12. jamka kmeny č. 089W, 092W, 093W, 096W, 097W, 101W – negativní geny TSPE4.C2; 13. jamka kmen č. 103W – pozitivní gen TSPE4.C2 (152 bp); 14. jamka kmen č. 105W – negativní gen TSPE4.C2.; 15. jamka kmen č. 106W – pozitivní gen TSPE4.C2 (152 bp); 16. jamka – kontrola.....</i>	54

- Obr.12. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2.-10. jamka kmeny č. 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230 – pozitivní geny *iss* (309 bp); 11. jamka kontrola; 12.-14. jamka kmeny č. 222, 223, 224 – negativní geny na *tsh*; 15. jamka kmen č. 225 – pozitivní gen na *tsh* (824 bp); 16. jamka vzorek č. 226 – negativní gen *tsh*.....58
- Obr.13. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2.-6. jamka kmeny č. 087W, 084W, 095W, 096W, 097W – negativní geny *chuA*, nespecifické geny kolem 900-1000 bp; 7. a 8. jamka kmeny č. 087W a 094W – negativní geny *yjaA*; 9. jamka kmen č. 103W – pozitivní geny *iss* (309 bp) a *papC* (501 bp), negativní gen *neuC*; 10. jamka kmen č. 105W – pozitivní gen *papC* (501 bp), negativní geny *iss* a *neuC*, nespecifický gen kolem 950 bp; 11. jamka kmen č. 106W – pozitivní geny *iss* (309 bp) a *papC* (501 bp), negativní gen *neuC*; 12. jamka kmen č. 103W – pozitivní geny *tsh* (824 bp) a *vat* (981 bp), negativní gen *iucD*; 13. jamka kmen č. 105W – negativní geny *iucD*, *tsh* a *vat*; 14. jamka kmen č. 106W - pozitivní geny *tsh* (824 bp) a *vat* (981 bp), negativní gen *iucD*.....59
- Obr.14. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2. jamka kmen č. 017 – pozitivní gen *eaeA* (241 bp); 3.-8. jamka kmeny č. 059, 062, 064, 066, 091W, 103W – negativní geny na *eaeA*; 9. a 10. jamka kmeny č. 104W, 105W – pozitivní geny na *eaeA* (241 bp); 11. jamka kmen č. 106W – negativní gen *eaeA*; 12. jamka kmen č. 107W – pozitivní gen *eaeA* (241 bp); 13. - 16. jamka kmeny č. 119W, 122W, 225, 226 – negativní geny *eaeA*.59
- Obr.15. Agarózový gel s PCR produkty. Zleva: 1. jamka 100 bp DNA marker; 2.-4. jamka kmeny č. 117W, 120W, 121W – negativní geny *E5* a *U*; 5.-7. jamka kmeny č. 112W, 113W, 114W – pozitivní gen *E7* (431 bp), negativní gen *B*; 8. a 9. jamka kmeny č. 116W a 117W – negativní geny na *E7* a *B*; 10. a 11. jamka kmeny č. 120W a 121W – pozitivní geny *B* (492 bp), negativní geny *E7*; 12.-14. jamka kmeny č. 112W, 113W, 114W –

*pozitivní geny E8 (449 bp), negativní geny E1; 15. a 16. jamka kmeny č.
116W a 117W - pozitivní geny E1 (649 bp), negativní geny*

E8.....62

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Sekvence primerů pro modifikovaný fylogenetický test (upraveno) [57]</i>	27
<i>Tab. 2. Původní metoda dle Clermonta (upraveno) [57]</i>	28
<i>Tab. 3. Modifikovaná metoda dle Doumitha (upraveno) [57]</i>	29
<i>Tab. 4. Složení MPA</i>	39
<i>Tab. 5. Složení MPB</i>	39
<i>Tab. 6. Sekvence primerů pro fylogenetickou analýzu (upraveno) [77]</i>	40
<i>Tab. 7. Primery 1. Skupiny (upraveno) [78]</i>	40
<i>Tab. 8. Primery 2. Skupiny (upraveno) [78]</i>	41
<i>Tab. 9. Primery 3. skupiny (upraveno) [79, 80]</i>	41
<i>Tab. 10. Kolicinové primery (upraveno) [81]</i>	42
<i>Tab. 11. Mikrocínové primery (upraveno) [81]</i>	43
<i>Tab. 12. Seznam použitých kmenů E. coli [77, 82, 83, 84, 85]</i>	45
<i>Tab.13. Složení směsi dle standardního protokolu (upraveno) [77]</i>	47
<i>Tab.14. Složení směsi dle metody Triplex PCR (upraveno) [77]</i>	48
<i>Tab.15. Směs pro jednoduchou reakci PCR – primery 1. skupiny (upraveno) [78]</i>	48
<i>Tab.16. Směs pro jednoduchou reakci PCR – primery 2. skupiny (upraveno) [78]</i>	49
<i>Tab.17. Směs pro jednoduchou reakci PCR – primery 3. skupiny [79, 80]</i>	49
<i>Tab.18. Směs pro multiplex reakci PCR – primery 1. a 2. skupiny (upraveno) [78]</i>	49
<i>Tab.19. Složení směsi pro jednoduchou PCR (upraveno) [81]</i>	50
<i>Tab.20. Rozřazení primerů do párů</i>	50
<i>Tab.21. Složení směsi pro duplex reakci PCR (upraveno) [84]</i>	51
<i>Tab.22. Podmínky PCR reakce</i>	51
<i>Tab.23. Podmínky PCR reakce – faktory virulence, primery 3. skupiny [80]</i>	51

<i>Tab.24. Výsledky fylogenetické analýzy.....</i>	<i>55</i>
<i>Tab.25. Faktory virulence – primery 1. skupiny.....</i>	<i>60</i>
<i>Tab.26. Faktory virulence – primery 3. skupiny.....</i>	<i>62</i>
<i>Tab.27. Výsledky bakteriocinotypizace – mikrociny.....</i>	<i>66</i>
<i>Tab.28. Výsledky bakteriocinotypizace – koliciny.....</i>	<i>66</i>

