Optimalizace PCR metody pro detekci *Salmonella* a *E. coli*

Bc. Jana Koubská

Diplomová práce
2009

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Jana KOUBSKÁ**
Studijní program:	**N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Téma práce:	**Optimalizace PCR metody pro detekci Salmonella a E. coli**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- **Charakteristika vybraných mikroorganizmů.**
- **Metody molekulární biologie.**
- **Metoda PCR.**
- **Praktické využití PCR pro detekci mikroorganizmů v potravinách.**

II. Praktická část

- **Optimalizace PCR pro detekci Salmonella a E. coli.**
- **Detekce Salmonella a E. coli v potravinách.**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] RUML, T., RUMLOVÁ, M. a kol. Genové inženýrství, VŠCHT v Praze, Praha 2002.
[2] TANG, I.W., PROCOP, G.W.et al. Molecular diagnostics of infectious diseases. Clinical chemistry 1997; 43:2021-2038.
[3] ROSYPAL, S. Úvod do molekulární biologie, 1. díl, Brno, 1999.
[4] SAMBROOK, J. Molecular cloning, third edition, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Magda Doležalová**
Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **18. února 2009**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. května 2009**

Ve Zlíně dne 31. května 2009

L.S.

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

V této práci byly přiblíženy nejpoužívanější metody molekulární biologie, z nichž největší pozornost byla věnována metodě PCR. O metodě PCR bylo pojednáno v teoretické části ve dvou samostatných kapitolách. Cílem praktické části bylo optimalizovat metodu PCR pro detekci *Salmonella* a *E. coli*. Byl sledován vliv annealingové teploty na výsledek detekce. Na základě optimalizace jednotlivých detekčních reakcí byla poté provedena paralelní detekce *Salmonella* a *E. coli* metodou multiplex PCR. Jelikož byly metodou multiplex PCR detekovány všechny specifické produkty, byla tato metoda aplikována na vzorky kuřecího masa a kuřecí kůže. Z uměle zaočkovaných vzorků byla DNA získána metodou povaření v PCR pufru. Použitím tohoto postupu v kombinaci s metodou multiplex PCR bylo umožněno současně detekovat bakterii *Salmonella* a *E. coli*.

Klíčová slova: polymerázová řetězová reakce, annealingová teplota, optimalizace, potraviny, *Salmonella, E. coli*

ABSTRACT

The most frequently used molecular biology methods are described in this work. PCR method is the most common used method in this field. The aim of the practical part was to optimise the PCR method for the detection of *Salmonella* and *E. coli*. The effect of annealing temperature on PCR was observed. Parallel detection of *Salmonella* and *E. coli* was carried out by multiplex PCR method. Based on these results the multiplex PCR method was applied to chicken meat and chicken skin samples. DNA was recovered from artificially inoculated samples by boiling in PCR buffer. Use of this procedure in combination with multiplex PCR method is suitable method for parallel detection of *Salmonella* and *E. coli*.

Keywords: polymerase chain reaction, annealing temperature, optimalization, food, *Salmonella, E. coli*

Děkuji Mgr. Magdě Doležalové za odborné vedení, cenné rady a připomínky při realizaci mé diplomové práce.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD **8**

I TEORETICKÁ ČÁST **9**

1 CHARAKTERISTIKA STUDOVANÝCH BAKTERIÍ **10**

1.1 ROD *ESCHERICHIA* 10

1.1.1 *Escherichia coli* 10

1.2 ROD *SALMONELLA* 11

1.2.1 Onemocnění způsobená salmonelou 12

2 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE **13**

2.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR) 13

2.2 HYBRIDIZAČNÍ METODY 13

2.2.1 Varianty hybridizace na pevném nosiči 14

2.2.2 Využití hybridizačních metod 14

2.3 METODY POLYMORFIZMU RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ (RFLP) 15

2.3.1 Restrikční endonukleázy 15

2.3.2 Využití metody RFLP 15

2.4 IMUNOLOGICKÉ METODY 15

2.4.1 Příklady imunologických metod 16

2.4.2 Využití imunologických metod 16

3 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR) **17**

3.1 PRINCIP PCR 17

3.2 AMPLIFIKAČNÍ PROFIL 18

3.3 KOMPONENTY REAKCE 18

3.4 PRŮBĚH AMPLIFIKAČNÍ REAKCE 20

3.5 DETEKCE AMPLIKONŮ 20

3.5.1 Elektroforéza 21

3.5.2 Gely 21

3.5.3 Vizualizace a identifikace DNA fragmentů 22

3.5.4 Automatické sekvencování 22

3.6 FALEŠNĚ POZITIVNÍ A FALEŠNĚ NEGATIVNÍ VÝSLEDKY 23

3.7 VYUŽITÍ PCR 23

3.8 MODIFIKACE PCR 24

4 PRAKTICKÉ VYUŽITÍ PCR PRO DETEKCI MIKROORGANIZMŮ V POTRAVINÁCH **25**

4.1 DETEKCE *SALMONELLA* 25

4.2 DETEKCE *ESCHERICHIA COLI* 27

4.3 DETEKCE OSTATNÍCH POTRAVINAMI PŘENÁŠENÝCH PATOGENNÍCH BAKTERIÍ 28

II PRAKTICKÁ ČÁST **29**

5 CÍL 30
6 MATERIÁL A METODY 31
6.1 PŘÍSTROJOVÁ TECHNIKA A POMŮCKY 31
6.2 CHEMIKÁLIE A REAKTANTY 31
6.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA 33
6.3.1 MPA (masopeptonový agar) 33
6.3.2 BHI (brain heart infusion) 33
6.3.3 BPW (buffered peptone water) 33
6.4 BAKTERIÁLNÍ KMENY 34
6.5 METODY 34
6.5.1 Kultivace bakterií 34
6.5.2 Kultivace bakterií pro přípravu vzorků potravin 34
6.5.3 Příprava vzorků potravin 34
6.5.4 Extrakce DNA povařením 34
6.5.5 Extrakce DNA pomocí Lego kitu 35
6.5.6 Extrakce DNA ze vzorků kuřete 35
6.5.7 PCR amplifikace 35
6.5.8 Muliplex PCR amplifikace 36
6.5.9 Amplifikační profil 36
6.5.10 Elektroforetická detekce amplikonů 36
7 VÝSLEDKY A DISKUZE 38
7.1 DETEKCE BAKTERIE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM 38
7.2 DETEKCE BAKTERIE *ESCHERICHIA COLI* 41
7.3 MULIPLEX PCR 45
7.4 POUŽITÍ MULTIPLEX PCR PŘI DETEKCI *SALMONELLA* TYPHIMURIUM A *E. COLI* Z KUŘECÍHO MASA 48
ZÁVĚR 52
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 53
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 62
SEZNAM OBRÁZKŮ 63
SEZNAM TABULEK 64

ÚVOD

Mnoho vysoce rizikových patogenních mikroorganizmů, které ohrožují zdraví lidí, je přenášeno potravinami. Následkem toho dochází k nárůstu onemocnění a úmrtnosti, kterou mohou některé případy končit. Potravinami přenášená onemocnění a otravy potravinami jsou velkým problémem veřejného zdraví a na jejich eliminaci jsou ročně vynakládány miliony dolarů. V rámci zlepšení kvality a bezpečnosti potravin je vysoký důraz kladen na kontrolu potravin. Přesná a rychlá detekce rizikových patogenů je tedy nezbytná.

V roce 2008 bylo v ČR hlášeno 20 175 případů bakteriálních střevních infekcí způsobených *Campylobacter*. *Campylobacter* je největším původcem enteritid. Druhé nejčastější střevní onemocnění představují infekce způsobené salmonelami. V roce 2008 bylo v ČR zaznamenáno 11 009 případů infekcí vyvolaných bakterií *Salmonella* [1].

Detekce rizikových patogenů je možná použitím tradičních kultivačních metod. Není však splněn požadavek na rychlost detekce. Kultivační metody jsou časově náročné a pracné, jejich provedení vyžaduje několik dnů. Proto je nutné vyvíjet metody, jimiž by byl zkrácen čas potřebný pro detekci.

Zařazením metod molekulární biologie při detekci mikroorganizmů je výrazně zkrácena doba potřebná pro detekci na několik hodin místo dnů. Kromě toho je použitím metod molekulární biologie dosahováno také vysoké citlivosti a specificity detekce. Mezi používané metody molekulární biologie patří metoda PCR, hybridizační metody, metoda RFLP nebo imunologické metody.

Metody molekulární biologie se dnes stávají platnou alternativou tradičním detekčním metodám a za čas jistě pro své výhody tyto metody plně nahradí.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA STUDOVANÝCH BAKTERIÍ

E. coli a *Salmonella* jsou fakultativně anaerobní bakterie zařazené do čeledi *Enterobacteriaceae*. Většina bakterií z této čeledi žije ve střevech obratlovců, ze kterých se dostávají do okolního prostředí, odpadních vod a hnojené půdy. Některé mikroorganizmy jsou součástí obligátní mikroflóry střeva, jiné jsou původci gastrointestinálních i jiných onemocnění člověka a zvířat. Z hlediska morfologie se jedná o tyčinky. Mezi charakteristické vlastnosti bakterií této čeledi patří: gramnegativita, oxidáza negativita, kataláza pozitivita, redukce nitrátů, zkvašování glukózy, optimum růstu při 37 ˚C. Rozdílnými vlastnostmi jsou pohyblivost, štěpení cukrů, utilizace citrátů, antigenní struktura [2, 3].

1.1 Rod *Escherichia*

Rod *Escherichia* zahrnuje rovné tyčinky, které se vyskytují jednotlivě nebo ve dvojicích. Většinou mají peritrichální bičíky popř. také fimbrie. Zkvašují glukózu většinou za tvorby plynu. Dalším zkvašovaným cukrem je laktóza. Nejvýznamnějším zástupcem je *Escherichia coli* [2, 4].

1.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli patří mezi obligátní mikroorganizmy střeva teplokrevných živočichů a člověka. Některé kmeny jsou užitečné tím, že se podílí na produkci vitaminů skupiny B a K. Kromě těchto kmenů však existují i kmeny patogenní [2]. Patogenní *Escherichia coli* je původcem dvou typů onemocnění. Mezi extraintestinální onemocnění jsou řazena onemocnění močových cest, septická onemocnění, infekce ran a hnisavé procesy. Extraintestinální onemocnění jsou vyvolána převážně kmeny, které mají polysacharidový kapsulární antigen; v močovém traktu kmeny, které mají tzv. P fimbrie, jimiž adherují na sliznici močových cest. V zažívacím traktu se určité kmeny *E. coli* uplatňují jako patogeny různými mechanizmy, podle kterých se tyto kmeny označují [5].

Enteropatogenní kmeny jsou vyvolavateli novorozeneckých průjmů. Příznaky onemocnění jsou vodnaté průjmy, které jsou příčinou dehydratace organizmu případně i smrti jedince. U větších dětí a u dospělých onemocnění vyvoláno není. Bylo prokázáno, že schopnost vyvolat novorozenecké průjmy je vázána pouze na některé sérotypy, které kolonizují tenké a tlusté střevo [5]. Nejznámější jsou sérotypy O55, O111, O126, O86 a další [6]. Infekce

enteropatogenními kmeny je spojena s charakteristickými ultrastrukturálními změnami v epiteliálních buňkách tenkého střeva. U těchto kmenů nebyla prokázána tvorba enterotoxinů. V rozvinutých zemích byl zaznamenán pokles infekcí způsobených enteropatogenními kmeny, v rozvojových zemích jsou však stále problémem [5].

Enterotoxigenní kmeny mohou vyvolat průjmy jak u dětí, tak i u dospělých. Tyto kmeny kolonizují tenké střevo pomocí kolonizačních faktorů, což jsou proteinové fimbrie, které jsou druhově specifické (pro člověka, pro selata, pro telata). Enterotoxigenní kmeny mohou produkovat dva typy enterotoxinů, a to termolabilní enterotoxin podobný choleragenu a termostabilní enterotoxin. Genetická informace pro tvorbu enterotoxinů je vázána na plazmidech. Enterotoxigenní kmeny se vyskytují převážně v endemicky v teplých oblastech (Mexiko, Bangladéš, Egypt), do střední Evropy se dostávají při návratu cestovatelů tzv. cestovatelské průjmy [5].

Enteoroinvazivní kmeny mají podobný mechanizmus patogenity jako *Shigella*, tj. pronikají do buněk a v nich se množí. Onemocnění probíhá jako bacilární dyzenterie [5]. Nejběžnějším sérotypem je O124 [6].

Enterohemoragické kmeny mají podobný mechanizmus adherence jako enteropatogenní kmeny, ale váží se převážně v tlustém střevě. Jsou producenty toxinu, který se označuje jako shiga-like toxin nebo verotoxin. Nejběžnějším sérotypem je O157:H7 [5]. Tyto kmeny jsou původci hemoragické kolitidy a hemolyticko-uremického syndromu (HUS) [7]. Onemocnění bývá často smrtelné, vyskytuje se v dětském věku, a to nejen v rozvojových zemích. Enterohemoragické kmeny byly zachyceny i v České republice [5].

1.2 Rod *Salmonella*

Do rodu *Salmonella* jsou zařazeny až na několik výjimek pohyblivé tyčinky se 4-5 peritrichálními bičíky. Nepohyblivé jsou *S. gallinarum* a *S. pullorum*. Bakterie se mohou vyskytovat v řetízcích, ale také jednotlivě nebo v párech. Většina salmonel má fimbrie adhezivního typu. Zkvašují glukózu většinou za tvorby plynu, maltózu a mannitol a produkují H_2S [2, 3].

Od roku 2005 jsou v rodu *Salmonella* zahrnuty dva druhy, *Salmonella enterica* a *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* je dále rozdělena do 6 subspecií, I- *S. enterica enterica*, II- *S. enterica salamae*, IIIa- *S. enterica arizonae*, IIIb- *S. enterica diarizonae*, IV- *S. enterica houtenae*, VI- *S. enterica indica* [8]. Na základě antigenní struktury je *Salmonella* klasifikována do jednotlivých sérovarů, kterých je dnes známo okolo 2500 [4].

Antigenní klasifikace salmonel je založena na tělových (somatických) antigenech O a bičíkových (flagelárních) antigenech H. Somatické O-antigeny mají lipopolysacharidový charakter. Bičíkový H-antigen je bílkovinné povahy a je termolabilní. Salmonely jsou obyvateli intestinálního traktu teplokrevných živočichů. Pro svou nenáročnost se mohou rozmnožovat i mimo tělo živočichů, především v potravinách živočišného původu. Přitom jsou uvolňovány toxiny [3].

1.2.1 Onemocnění způsobená salmonelou

Salmonely způsobují 3 typy onemocnění, které jsou nazývány salmonelózy. Nejzávažnějším typem salmonelového onemocnění je břišní tyfus. Je způsoben *S. typhi* a projevuje se krvavým průjmem, horečkou, bolestmi hlavy a břicha [3].

S. paratyphi A, B a C způsobuje onemocnění zvané paratyfus, které má obdobný, ale lehčí průběh než břišní tyfus. Tyfus a paratyfy jsou onemocnění, při kterých je zdrojem nákazy nemocný člověk nebo bacilonosič. Přenos nákazy se děje přímo stolicí nebo močí nemocného nebo nepřímo vodou, mlékem, potravinami atd. Infekce, jejímž původcem jsou zvířata, byly zjištěny pouze u sérotypu *S. paratyphi* B [3].

Nejběžnějším typem salmonelóz je gastroenteritida. Gastroenteritidy jsou způsobeny ostatními typy salmonel. Při tomto typu onemocnění jsou zdrojem nákaz nejčastěji zvířata a kontaminované potraviny. Potraviny mají ústřední postavení v šíření a pomnožování salmonel, zejména kontaminovaná vejce, drůbež, masné a mléčné výrobky. Mezi příznaky gastroenteritidy jsou řazeny horečka, nevolnost, vodnaté průjmy, zvracení, bolesti hlavy. Onemocnění se u člověka projeví za 6 až 8 hodin po požití kontaminované potraviny, trvá 5 až 10 dnů, ale exkrece bakterií přetrvává až několik týdnů [3].

2 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Molekulární biologie je základem moderní genetiky, vychází z biochemických poznatků a studuje přenos genetické informace na molekulární úrovni [9]. K nárůstu znalostí v oblasti molekulární biologie došlo až v několika posledních desetiletích 20. století a techniky molekulární biologie přinesly významné objevy v mnoha vědních oborech, především bakteriologii [10].

Metody molekulární biologie používají technologii amplifikace (zmnožení) nukleových kyselin *in vitro*. Amplifikační technika výrazně zvyšuje citlivost detekce při zachování vysoké specificity reakce. Produkt amplifikace tzv. amplikon může být charakterizován různými postupy, které zahrnují hybridizaci s použitím sondy, analýzu fragmentů vzniklých štěpením restrikční endonukleázou nebo přímou analýzu sekvencí. Na rozdíl od tradičních detekčních metod není při identifikaci mikroorganizmů požadována časově náročná kultivace. Po této stránce tak metody molekulární biologie překonaly tradiční metody detekce [11]. Mezi významné molekulárně-biologické metody patří polymerázová řetězová reakce, hybridizační metody, metoda polymorfizmu délky restrikčních fragmentů a imunologické metody.

2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je nejznámější a nejvyužívanější molekulárně-biologická metoda a má velký význam ve výzkumu i praxi. V PCR jsou využity procesy denaturace, hybridizace a syntézy DNA. Použitím této metody je umožněna amplifikace DNA z nepatrného množství biologického materiálu [9]. O PCR bude podrobně pojednáno v následující kapitole.

2.2 Hybridizační metody

Hybridizační metody jsou založeny na identifikaci určitých částí genomu pomocí uměle připravených úseků DNA se známou sekvencí, které jsou nazývány sondy. Každá sonda je označena [9]. Značení je často prováděno pomocí fluorescenčních barviv (rhodamin, fluorescein, fluorochrom) nebo radioaktivních prvků (^{32}P, ^{3}H, ^{125}I) [8,11,12,13]. Tam, kde je sekvence analyzovaného vzorku komplementární k sekvenci sondy, dojde k hybridizaci (navázání), což se projeví radioaktivitou nebo fluorescencí [13].

Hybridizace je většinou prováděna na pevných nosičích, nejčastěji jsou to membrány z nitrátu celulózy nebo nylonu. Přenos na membránu je uskutečněn prostou difuzí působením kapilárních sil, za pomoci vakua nebo působením elektrického proudu [15]. Principem hybridizace je denaturace a reasociace DNA [9]. V postupu hybridizace jsou zahrnuty čtyři kroky. Prehybridizace, při které je zabráněno nespecifickému navázání sondy obsazením volných míst na membráně. Druhým krokem je vlastní hybridizace. Poté je nenavázaná sonda odstraněna promýváním. Na závěr je provedena detekce sondy [16]. Pro přesnou hybridizaci musí být zajištěna určitá teplota a koncentrace iontů v hybridizačním roztoku, které lze experimentálně odvodit od teploty tání sondy [17].

2.2.1 Varianty hybridizace na pevném nosiči

K variantám hybridizace na pevném nosiči patří Southern blotting, Northern blotting, Western blotting a hybridizace in situ**.**

Southern blotting je přenos DNA, Northern blotting je přenos RNA a Western blotting je přenos proteinů [15]. Vzniklé fragmenty jsou separovány většinou pomocí horizontální elektroforézy v agarózovém gelu, ve kterém jsou rozděleny podle velikosti. Protože tato mobilní fáze není vhodná pro další analýzu, je provedena fixace na pevném nosiči. V případě dvouřetězcových molekul je před přenosem molekuly provedena ještě chemická denaturace [18]. Elektroforetické separaci obvykle ještě předchází štěpení restrikční endonukleázou. Tyto metody poskytují dvojí informaci, jednak o přítomnosti a jednak o velikosti nukleové kyseliny nebo proteinu, které hybridizovaly se sondou [15].

Metoda in situ hybridizace je založena na tom, že hybridizace probíhá přímo v biologickém materiálu, v morfologicky intaktní tkáni, v buňkách nebo na chromozomech, které jsou fixovány na mikroskopickém sklíčku [9,15].

2.2.2 Využití hybridizačních metod

Hybridizační metody jsou vysoce specifické, ale jsou omezeny jejich nižší citlivostí. Jejich citlivost je postačující, když je hybridizační sondou určeno, zda v kultuře vypěstovaný mikroorganizmus geneticky odpovídá danému druhu či kmenu. Zmíněná citlivost nemusí být dostačující, když je původce onemocnění prokazován přímo ve vzorku, který byl odebrán pacientovi, zvláště když v procesu izolace nukleové kyseliny dochází ke ztrátám [19]. Hybridizační metody jsou využívány v klinické genetice k průkazu delecí nebo amplifikací jednotlivých genů popř. celých chromozomů, protože tyto změny mohou být

zodpovědné za mnohá závažná postižení. Hybridizační metody slouží také k vyšetření některých infekčních onemocnění, zejména virových [9].

2.3 Metody polymorfizmu restrikčních fragmentů (RFLP)

Principem této metody je rozdílnost v homologických sekvencích DNA různých organizmů. Tato rozdílnost je detekována přítomností DNA fragmentů různých délek po štěpení vzorku DNA. DNA je štěpena ve specifických místech pomocí enzymů, které jsou nazývány restrikční endonukleázy [20]. Jednotlivé kroky RFLP zahrnují štěpení DNA restrikčními enzymy, separaci fragmentů gelovou elektroforézou a identifikaci fragmentů (Southernova hybridizace) [16].

2.3.1 Restrikční endonukleázy

Restrikční endonukleázy byly nalezeny u mnoha bakteriálních kmenů, jejich biologická funkce spočívá v ochraně bakteriální buňky, kdy restrikční endonukleázy odbourávají cizorodou DNA. Před účinkem cizorodé DNA je bakteriální buňka chráněna metylací v cílových místech [21]. Cílové místo restrikčních endonukleáz je tvořené krátkou obvykle 4 až 7 nukleotidovou sekvencí na dvouřetězcových molekulách DNA. Tato skevence je velmi často palindromatická, tzn. že na obou vláknech DNA ve směru od 5´konce mají nukleotidy stejné pořadí [16]. Restrikční endonukleázy jsou rozděleny do tří tříd podle jejich složení, požadavků na kofaktory a podle způsobu štěpení DNA. Restrikční enzymy třídy II jsou nejvhodnější pro analýzu DNA. DNA je štěpena vždy ve stejném místě a cílové místo těchto restrikčních enzymů je obvykle palindromatické [22].

2.3.2 Využití metody RFLP

Pomocí metody RFLP lze studovat rozdílnosti genomů organizmů, rozdílnosti jednotlivých rodů, druhů částečně i poddruhů, ale ne rozdíly mezi blízce příbuznými populacemi [23].

2.4 Imunologické metody

Imunologické metody využívají reakce antigenu a protilátky a vysoké afinity obou molekul [24]. Proniknutím antigenu do organizmu je vyvolána tvorba protilátek. Protilátky jsou proteiny známé jako imunoglobuliny. Protilátky mohou být monoklonální nebo polyklonální. Polyklonální protilátky jsou produkovány různými klony lymfocytů B a jejich preparát tedy může obsahovat směs proteinů. Jsou získávány z krevního séra

imunizovaného laboratorního zvířete. Monoklonální protilátky jsou produkovány populací identických buněk a jejich preparát je vždy homogenní [25, 26]. Při přípravě monoklonálních protilátek je využita technologie hybridomů. Hybridomy jsou připraveny fúzí lymfocytů B imunizovaného zvířete (slezinný lymfocyt myši) a myelomových buněk (nádorově změněná plazmatická buňka). Lymfocyt B je nositelem specificity produkované protilátky a přítomností myelomová buňky je umožněn nepřetržitý růst hybridomu. Reakce s monoklonálními protilátkami poskytují specifičtější a přesnější výsledky [27, 28]. Antigen nebo protilátka jsou označeny molekulou, která po vzniku imunokomplexu signalizuje přítomnost antigenu nebo protilátky. Ke značení mohou být použity radioizotopy, enzymy, které mění barvu roztoku, nebo substance, které jsou schopny vysílat záření [29].

2.4.1 Příklady imunologických metod

Mezi používané imunologické metody patří metoda radioimunologická, imunoenzymatická a imunofluorescenční.

Principem radioimunologické metody (RIA) je soutěž mezi neznačeným antigenem a radioaktivně značeným antigenem o návázání se na protilátku. Značení je obvykle provedeno pomocí radiozotopu I^{125}. Výsledkem testu je měření radioaktivity [30].

Imunoenzymatická metoda (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) je založena na podobném principu jako RIA. Místo značení radioizotopem je však užito navázání se enzymu na protilátku. Reakce enzymu s bezbarvým substrátem vede ke vzniku barevného produktu, jehož množství je měřeno spektrofotometricky. Mezi enzymy, které jsou používány, patří peroxidáza, alkalická fosfatáza atd. [30].

Při imunofluorescenční metodě (IFA) je protilátka označena fluorochromem. Nejčastěji užívanými fluorochromy jsou fluorescein a rhodamin. Fluorochromy jsou schopné absorbovat světlo určité vlnové délky a emitovat světlo o vyšší vlnové délce. K hodnocení testu jsou používány fluorescenční mikroskopy se zdrojem UV-záření [30].

2.4.2 Využití imunologických metod

Imunologické metody jsou úspěšně využívány k detekci bakteriálních patogenů a toxinů [17].

3 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla jako laboratorní technika koncipována v roce 1983 v laboratořích Cetus Corporation v Kalifornii Kary Mullisem v rámci řešení exponenciální amplifikace oligonukleotidů v tzv. beta-globinovém programu [19]. Tento americký vědec za svůj objev obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. Metoda PCR je založena na schopnosti DNA-polymerázy tvořit kopie DNA řetězce, na principu komplementarity dochází k elongaci nového DNA řetězce podle úseku řetězce původní DNA, který je vymezen dvěma primery [11]. Vzhledem k vysoké citlivosti detekce je možné PCR použít pro zjištění přítomnosti velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku, teoreticky by měla stačit jedna molekula DNA nebo ve zvláštních případech RNA [31].

3.1 Princip PCR

PCR je tedy enzymově řízená, primery zprostředkovaná, na teplotě závislá reakce pro replikaci specifické DNA sekvence *in vitro* [10]. Podstatou PCR je opakování se cyklů amplifikace vybrané sekvence nukleové kyseliny [11]. Každý cyklus je složen ze tří jednoduchých reakcí, které probíhají za stejných podmínek a liší se pouze hodnotou použité reakční teploty. Tři reakce zahrnují denaturaci, annealing a extenzi [10].

1. Denaturace

   Vyšetřovaná DNA je denaturována tepelně. Při teplotě větší než 90 ˚C jsou rozvolňovány vodíkové můstky, kterými jsou spojeny purinové a pyrimidinové báze vzájemně komplementárních nukleotidů. Výsledkem tohoto procesu je jednořetězcová DNA, která v další reakční fázi slouží jako matrice pro syntézu nového komplementárního řetězce [19].

2. Annealing

   Annealing je proces hybridizace, tj. komplementárního navázání primerů na cílové sekvence matricového řetězce. Místa vazby primerů vymezují oblast DNA, která bude v dalších cyklech amplifikována. Annealing probíhá při teplotě 45 - 65 ˚C [9].

3. Extenze

   Extenze je enzymatický proces prodlužování řetězců DNA, který probíhá při teplotě 72 ˚C. Na 3´-OH konce navázaných primerů nasedá DNA-polymeráza, která k primerům připojuje nové nukleotidy. Tím dochází k prodloužení řetězce ve směru 5´→3´ [9].

Výsledkem procesu je nově vytvořená dvouřetězcová DNA, tzv. amplikon. Protože dochází k amplifikaci obou řetězců matricové DNA, vzniknou v průběhu cyklu z jedné výchozí molekuly dva amplikony. V každém následujícím cyklu je počet amplikonů opět zdvojnásoben [19]. Po proběhnutí n cyklů by mělo být ve finálním produktu obsaženo 2^n kopií původního templátu DNA [10]. Ve skutečnosti je tento počet o něco menší, neboť může docházet k chybám a teprve ve třetím cyklu jsou vytvářeny amplikony, jejichž délka odpovídá délce amplifikovanému úseku [9]. Riziko chyb je tím větší, čím delší je amplifikovaný úsek a čím vyšší je obsah C-G bází. Proto je doporučeno provádět 35-40 na sebe navazujících cyklů [19].

3.2 Amplifikační profil

Amplifikační profil je zpravidla určen empiricky. Kromě počtu cyklů jsou v něm zahrnuty teplotní a časové údaje pro průběh jednotlivých reakcí cyklu a preamplifikační a postamplifikační stabilizační teploty. Časové údaje pro jednotlivé reakce jsou závislé na délce amplifikovaných úseků [19]. Zařazením preamplifikační stabilizační teploty tzv. počáteční denaturace do reakce, je umožněna kompletní denaturace templátu. Je tak zabráněno renaturaci DNA a nespecifickému navázání primerů. Zahřátí probíhá 1-5 minut při teplotě 95 ˚C [31]. Postamplifikační stabilizační teplota tzv. závěrečná extenze navazuje na poslední cyklus polymerázové řetězové reakce a probíhá při teplotě 72 ˚C několik minut. V této fázi je dokončena syntéza amplikonů [32].

3.3 Komponenty reakce

Reakční směs pro PCR je složena z teplotně-rezistentní DNA-polymerázy, pufru, dNTP, templátové DNA a dvojice primerů [33].

Teplotně rezistentní DNA-polymeráza

Termostabilita DNA-polymerázy je důležitou podmínkou reakce, protože jedním z kroků polymerázové řetězové reakce je denaturace. Denaturace je prováděna při teplotě asi 95 ˚C, při které jsou všechny běžné enzymy inaktivovány. Použitím termostabilní DNA-polymerázy je zajištěna dostatečná aktivita enzymu po celou dobu amplifikace. Při amplifikacích je většinou používána *Taq* DNA-polymeráza [31]. Její název je odvozen z druhového názvu bakterie, ze které byla polymeráza izolována. *Taq* DNA-polymeráza byla izolována z bakterie *Thermus aquaticus,* která se vyskytuje ve vývěrech horkých

minerálních pramenů [9]. Její teplotní optimum je 75 ˚C a její životnost je asi 40 minut při teplotě 95 ˚C. Tento enzym vykazuje pouze 5´→3´ polymerázovou aktivitu, postrádá 3´→5´exonukleázovou aktivitu, což znamená, že není umožněna oprava chyb, které vznikají při replikaci. Vzniklé amplifikační produkty tak mohou obsahovat nesprávně inkorporovanou bázi. Většině aplikací je však přesnost *Taq* DNA-polymerázy dostačující. Výhodou této polymerázy je její vysoká procesivita. Tímto termínem je označena schopnost syntetizovat dlouhé, až 10 kb dlouhé, úseky DNA [31].

Kromě *Taq* DNA-polymerázy mohou být použity např. také *Pwo* a *Pfu* DNA-polymerázy, jejichž zdrojem jsou *Pyrococus woesei* a *Pyrococus furiosus*. Tyto enzymy vykazují i 3´→5´ exonukleázovou aktivitu, kterou je umožněna oprava chybně inkorporovaných deoxynukleotidů. Jejich nevýhodou je nižší procesivita. Jsou používány pro klonování fragmentů, charakterizaci jednotlivých buněčných populací v kultuře atd. [31].

PCR pufr

Základem pufru pro PCR je síran amonný nebo chlorid draselný. V pufru je dále obsažena Tris-HCl (pH 8,8 při 25 ˚C) a chlorid hořečnatý, ale PCR pufr může být dodáván i bez něho, čímž je usnadněna optimalizace reakčních podmínek [33].

dNTP mix

dNTP je vodný roztok, ve kterém je obsažena ultračistá směs každého ze čtyř nukleotidů dATP, dCTP, dGTP a dTTP [33].

Templátová DNA

Cílová DNA může být získána z různých zdrojů, z buněk prokaryot, eukaryot a virů [25].

Primery

Primery jsou krátké syntetické oligonukleotidy o známé sekvenci, které jsou zpravidla tvořeny 20-25 nukleotidy. Jsou komplementární ke koncovým oblastem fragmentu DNA, jenž má být amplifikován [9, 19]. Pro PCR reakci je nutné použít dva primery. Forward primer (kódující, upstream), po jehož nasednutí na 5´-konec řetězce je směr elongace dán směrem transkripce, a reverse primer (antikódující, downstream), který nasedá na 3´-konec řetězce a elongace probíhá opačným směrem než transkripce [34]. Pro každou polymerázovou řetězovou reakci je potřeba navrhnout vhodný pár primerů. Při návrhu primerů musí být zajištěno, aby oba primery měly podobnou teplotu tání. Teplota tání je závislá na délce molekuly a její sekvenci. Čím je molekula delší, tím vetší energie je nutná k její denaturaci, protože obsahuje více vodíkových můstků. Čím více G-C párů je

v molekule obsaženo, tím je teplota tání vyšší. Annealingová teplota, při které dochází k nasedání primerů, musí být pak o něco nižší, než je teplota tání, eliminuje se tím nestabilní nasednutí primerů. Konkrétní annealingová teplota je určena experimentálně, optimalizací podmínek reakce. Primery nesmí být vzájemně komplementární, jinak hrozí vznik dimerů a vlásenek. Dimer vzniká spárováním dvou primerů, podmínkou jeho vzniku je delší komplementární úsek v sekvenci obou primerů. Vlásenka vzniká spárováním konců stejného primeru, podmínkou je opět dostatečná komplementarita mezi konci primeru. Dimery i vlásenky mají za následek, že PCR neproběhne [35]. Ve většině reakcí je tedy vhodná sekvence a koncentrace primerů parametrem, který rozhoduje o úspěšném výsledku reakce [31].

3.4 Průběh amplifikační reakce

Amplifikační reakce je prováděna v tenkostěnných zkumavkách o objemu 200 nebo 500 mikrolitrů, v závislosti na typu termocykleru [19]. Termocykler je programovatelný termostat, do jehož bloku jsou zkumavky umístěny a který je schopen přechodu mezi jednotlivými teplotami při amplifikační reakci. Hlavními požadavky jsou přesnost teploty a rychlost přechodu mezi jednotlivými teplotami [31]. Většina moderních přístrojů je opatřena vyhřívaným víkem, je tak zabráněno kondenzaci kapalné reakční směsi na vnitřní straně víka zkumavky a kontaminaci laboratoře produkty amplifikace při otevření zkumavky. Pokud není termocykler vybaven vyhřívaným víkem, je reakční směs vrstvena minerálním olejem, kterým je zabráněno vypařování reakční směsi [19].

3.5 Detekce amplikonů

Po proběhnutí PCR je získána směs, ve které je obsaženo velké množství amplifikovaných fragmentů. Aby tyto amplikony mohly být detekovány, musí být nejprve odděleny od zbytku DNA. Nejvíce používanou separační metodou je v tomto případě elektroforéza [9]. V závislosti na detekční technice jsou poté amplikony buď ponechány v ds formě, v případě že je detekční metodou elektroforéza, nebo jsou chemicky denaturovány na ss formu, v případě že je při detekci použita Southernova hybridizace nebo sekvenování [19].

3.5.1 Elektroforéza

Elektroforéza je elektromigrační metoda, při které je využito schopnosti pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Obvykle je prováděna v gelu, a to buď agarózovém nebo polyakrylamidovém [36]. Volba prostředí závisí na velikosti analyzovaných fragmentů a na délkových rozdílech mezi nimi [18]. Fragmenty DNA jsou nabity záporně (je to dáno obsahem aniontových skupin PO_4^{3-}) a jsou přitahovány ke kladné elektrodě. Rychlost migrace je pak dána velikostí fragmentů. Pokud jsou tedy vytvořeny fragmenty o rozdílné délce, je na elektroforetickém gelu dosaženo jejich rozdělení působením stejnosměrného elektrického proudu. Protože gely tvoří poměrně hustou síť, je průchod větších molekul pomalejší a kratší úseky DNA jsou nalezeny ve větší vzdálenosti od nanášecí jamky [9, 36].

3.5.2 Gely

Agarózový gel je vytvořen rozpuštěním polysacharidu agarózy v horké vodě. Pro elektroforézu nukleových kyselin jsou používány gely obsahující 0,5 až 4 % agarózy. Čím je obsah polysacharidu vyšší, tím je dosaženo lepší rozlišovací schopnosti gelu, ale tím je také průběh elektroforézy pomalejší a příprava gelu je technicky náročnější [9, 36]. Agarózové gely umožňují purifikaci a separaci nativní, štěpené nebo amplifikované DNA a také RNA [18].

Jiným nosičem používaným při elektroforéze nukleových kyselin je polyakrylamidový gel. Základní jednotkou polyakrylamidového gelu je monomer, akrylamid, který polymeruje v přítomnosti volných radikálů, které jsou poskytovány amonium persulfátem za přítomnosti katalyzátoru TEMED (N,N,N´,N´-tetrametylenetylen diamin). Vzniklé řetězce jsou zesíťovány v přítomnosti N,N´-metylenbisakrylamidu a tak vznikne porózní gel. Oproti agarózavému gelu má tento gel vyšší rozlišovací schopnost (1bp/1000bp), umožňuje akomodaci většího množství NK a z gelu zpětně získaná DNA je extrémně čistá. Jsou používány dva typy polyakrylamidového gelu, nedenaturační a denaturační. Nedenaturační polyakrylamidový gel je používán k separaci dsDNA, použitím denaturačního polyakrylamidového gelu je umožněna separace ssDNA např. při sekvenování. Jako denaturační činidlo je používána urea nebo formamin [18]. Molekulové síto polyakrylamidového gelu je poměrně husté, proto se hodí pro rozdělování kratších fragmentů [36].

3.5.3 Vizualizace a identifikace DNA fragmentů

Do agarózového gelu je většinou přímo přidáváno barvivo etidiumbromid. Pokud ne, je gel po separaci barven vložením do fotomisky, ve které je obsažen roztok etidiumbromidu. Etidiumbromid se interkaluje mezi vlákna dsDNA a během ozáření UV-zářením na transluminátoru o vlnové délce 260-360 nm červeno-oranžově fluoreskuje. Pro posouzení velikosti jednotlivých fragmentů jsou používány velikostní markery známých molekulových hmotností, což jsou komerčně dostupné směsi fragmentů DNA definovaných velikostí. Markery jsou připravené štěpením plazmidové nebo fágové DNA restrikčními endonukleázami [18].

Při barvení polyakrylamidového gelu jsou používány stejné techniky jako při barvení agarózového gelu, tj. barvení etidiumbromidem. Ale díky tomu, že je polyakrylamid méně reaktivní než agaróza, může být k barvení gelu používána také metoda stříbření, kterou je umožněna detekce i o několik řádů nižšího množství DNA [36].

Jinou možností detekce je Southernova hybridizace se značenými sondami (viz. kapitola hybridizační metody) nebo metoda automatického sekvencování [16].

3.5.4 Automatické sekvencování

Automatické sekvencování je modifikací PCR. K analýze je použit pouze jeden primer, který je komplementární k počáteční oblasti sekvencovaného úseku DNA. Dochází tak k amplifikaci jednoho řetězce DNA. V reakční směsi jsou kromě běžných komponent obsaženy také dideoxynukleozidtrifosfáty, každý druh dideoxynukleozidtrifosfátu je označen jiným fluorescenčním barvivem. Dideoxynukleozidtrifosfáty jsou inhibitory elongace, protože mají na 3´uhlíkovém atomu deoxyribózy místo hydroxylové skupiny navázaný vodík. Produktem reakce je velké množství fluorescenčně značených fragmentů různé délky, které jsou poté elektroforeticky rozděleny na polyakrylamidovém gelu. Podle výskytu specifického fluorescenčního barviva na konci každého fragmentu lze zjistit, kterým ddNTP byla syntéza ukončena. Pořadí těchto ddNTP na koncích jednotlivých úseků udává sekvenci analyzovaného DNA řetězce. U automatickách sekvenátorů, které umožňují přesné seřazení fragmentů podle velikosti a následné automatické odečtění sekvence zkoumané DNA, je délka fragmentů snímána pomocí laserového detektoru. K vyhodnocení výsledků pak slouží specializovaný počítačový software [9, 18].

3.6 Falešně pozitivní a falešně negativní výsledky

Největším problémem, který může při PCR nastat, je vznik falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Falešně pozitivní výsledky jsou zdůvodněny kontaminací vzorků a tak amplifikací nespecifických produktů. Nejčastějšími zdroji kontaminace jsou křížová kontaminace mezi vzorky, kontaminace vybavení a činidel používaných při analýze, hromadění určitých amplikonů v laboratořích při časté amplifikaci stejné cílové sekvence [37]. Z tohoto důvodu by měly mít laboratoře oddělené místnosti pro provádění jednotlivých kroků PCR procedury, pro analýzu vzorků a pro přípravu vzorků a činidel. V laboratořích by měly být dodržovány stringentní podmínky jako prevence kontaminace, tj. používání jednoúčelových pipet, zkumavek atd. Falešně negativní výsledky jsou způsobeny přítomností různých substancí ve vzorku, které inhibují extrakci nukleových kyselin nebo jejich amplifikaci [38]. Proto jsou prováděny negativní a pozitivní kontroly. Mohou zahrnovat kontrolu extrakce DNA, kontrolu PCR setu, kontrolu PCR amplifikace. Pozitivní kontrola, která je požadována pro sledování účinnosti PCR, může být provedena umělým zaočkováním vzorku mikroorganizmem, např. zaočkování vzorku krve *E. coli*. Negativní kontrola, kterou je sledována případná kontaminace, je postup, při kterém je templát přidávaný do reakční směsi nahrazen destilovanou vodou [10, 39].

3.7 Využití PCR

Metoda PCR nachází uplatnění při syntéze fragmentů DNA na základě chromozomální DNA nebo RNA (jako cDNA získaná reverzní transkripcí mRNA) při přípravě DNA sond pro hybridizace, přípravě templátu pro sekvenování. Široké uplatnění této metody bylo nalezeno rovněž v genetice, medicíně a diagnostice při mapování genomů a charakterizaci genů, izolaci genů za vzorků tkáně, prenatální diagnostice dědičných chorob, analýze alelických sekvenčních změn, určování paternity, detekci infekčních mikroorganizmů v potravinách, vodě, půdě a klinických vzorcích a při kontrole výrobků (zjišťování geneticky modifikovaných potravin nebo mikrobiologické kontrole jakosti). PCR je využívána také v kriminalistice při průkazu identity a v archeologii při analýze prehistorických DNA z fosílií [31].

3.8 Modifikace PCR

Kromě standardního provedení PCR existují i modifikace polymerázové řetězové reakce. Nejvíce používanými metodami jsou multiplex PCR, nested PCR, real-time PCR a reverzní PCR.

Multiplex PCR

Pricipem této metody je přidání dvou nebo více párů primerů do reakční směsi. Tím je možno analyzovat více různých vzorků DNA najednou či sledovat více genů v jednom vzorku [10]. Použité primery nesmí být vzájemně komplementární, měly by mít podobou teplotu hybridizace a délka produktů namnožených zvolenými primery by měla být rozlišitelná při separaci [18].

Nested PCR

Tato metoda je založena na dvou po sobě následujících amplifikačních reakcích. Při reakci jsou použity dva páry primerů, vnitřní a vnější. Produkt první amplifikační reakce, ve které je jako templát použita DNA izolovaná z testovaného vzorku, je delší a slouží jako templát pro druhou amplifikaci. Při druhé reakci je amplifikována vnitřní sekvence primárního amplikonu. Tím je umožněno zvýšení citlivosti a přesnosti detekce [10, 18].

Real-time PCR

Principem real-time PCR je přímá detekce a kvantifikace PCR produktů v každém jednotlivém cyklu PCR. Během amplifikace je stanovena změna intenzity fluorescenčního záření. Při reakci je využíváno interkalační barvivo SYBR Green I, které je vázáno mezi vlákna DNA. Během elongace je množství barviva zvyšováno a tím je zvyšována i intenzita fluorescence. Nevýhodou inkerkalačního barviva je, že může být vázáno i nespecifickou DNA. Pro specifickou detekci jsou používány komplementární specifické sondy (TaqMan, Hi probes-Dual Probes, Molecular Beacons). Sondy obsahují dvojici fluoroforů, které fungují jako zhášeč a zářič. U sondy, která je v inaktivním stavu, tlumí zhášeč všechno záření emitované zářičem, protože se oba fluorofory nachází v těsné blízkosti. Když se při reakci zhášeč a zářič od sebe vzdálí, dojde k ukončení efektu zhášení a nárůstu fluorescenčního signálu [18].

Reverzní (zpětná) PCR

Metoda byla vyvinuta pro detekci RNA. Principem této metody je přepsání templátové mRNA do cDNA, která je poté podrobena PCR [18].

4 PRAKTICKÉ VYUŽITÍ PCR PRO DETEKCI MIKROORGANIZMŮ V POTRAVINÁCH

Mezi potravinami přenášené bakterie, které vyvolávají největší množství onemocnění, jsou řazeny *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157: H7, *Clostridium perfringens* a *Listeria monocytogenes* [40]. Ve světě je počet případů gastroenteritid spojených s konzumací potravin odhadován na 68 až 275 milionů ročně. Hlavním problémem při detekci potravinami přenášených patogenů je to, že jsou ve vzorku obvykle přítomny ve velmi malých množstvích mezi miliony ostatních bakterií. Druhým problémem je přítomnost složek potravin, které jsou inhibitory detekčních reakcí [41]. Tradiční mikrobiologické metody zahrnující mnohonásobnou kultivaci a kroky biotypizační nebo sérotypizační identifikace jsou časově náročné (asi 5 dní) a pracné. Proto byly nahrazeny rychlejšími metodami, jako je hybridizace, imunologická enzymová zkouška a metoda PCR [41, 42, 43]. Nástupem technik založených na identifikaci genomu tak vznikly účinné metody, kterými mohou být jednotlivé patogeny identifikovány bez potřeby izolace čistých kultur. Metodou PCR je umožněna milionová amplifikace specifické oblasti genu, která je zapojena do patogenity mikroorganizmů. Amplifikace je provedena *in vitro* a může být použita k nepřímé detekce velmi malého počtu patogenů [41].

V této kapitole bude v souvislosti s tématem diplomové práce pozornost zaměřena na detekci *Salmonella* a *E. coli*.

4.1 Detekce *Salmonella*

Salmonella je původce onemocnění zvaného salmonelóza. Dříve byly salmonelózy spojené s konzumací kontaminovaných potravin živočišného původu, jako je drůbeží maso, vejce, maso a mléčné výrobky. Změny v zemědělské praxi, stravovací návyky a rostoucí dovoz čerstvých výrobků jsou nejspíše hlavími příčinami toho, že některé případy onemocnění byly vyvolány také konzumací ovoce a zeleniny. Byly popsány salmonelózy spojené například s konzumací rajčat, růžičkové kapusty, vodních melounů, pomerančového džusu a jablečného moštu. *Salmonella* je schopna rozmnožovat se ve velkém množství potravin, a proto jsou rychlé a citlivé metody pro detekci této bakterie důležité pro zajištění bezpečnosti výrobků. K detekci *Salmonella* jsou úspěšně používány metody, které jsou založeny na polymerázové řetězové reakci, a to nejenom PCR v základním provedení, ale

také její modifikace, jako je multiplex PCR, real-time PCR a nested PCR. Jako cílové oblasti jsou využívány různé geny, např. *invA*, gen pro 16S rRNA, *fimA*, *viaB*, geny na plazmidech spojené s patogenitou *Salmonella* jako *hilA* a *sirA* [44].

Sekvencí *fimA* genu je kódována fimbriálni podjednotka *Salmonella*. Tento gen byl využit pro detekci *Salmonella* spp. metodou tradiční PCR v komerčně vyrobených vzorcích krmiv. Metoda se ukázala být specifická pouze pro kmeny *Salmonella* [41].

V genu *invA* je zakódována struktura proteinu spojeného s virulencí *Salmonella*. Sekvence tohoto genu byla použita pro detekci *Salmonella* metodou real-time PCR ze vzorků hovězího, vepřového a kuřecího masa, ze vzorků krmiv a také ze zvířecích klinických vzorků. V závislosti na vzorku, ze kterého byla *Salmonella* detekována, se citlivost detekce pohybovala v rozmezí 97,1 až 100,0 % a specificita detekce se pohybovala v rozmezí 91,3 až 100,0 % [45].

Sekvencí genu *sefA* je kódován fimbriální protein *Salmonella* Enteritidis. Sekvence tohoto genu byla využita pro detekci *Salmonella* Enteritidis ve vejcích metodou real-time PCR. Bylo možno detekovat méně než 1 CFU · 600 g^{-1} vzorku [46].

Oblastí genu *aceK* je kódována izocitrátdehydrogenáza, tato oblast je specifická pro detekci *Salmonella* spp. Sekvencí genu *fliC* je kódován I-antigen specifický pro *S.* Typhimurium a *S.* Kentucky. *sdf* oblast, jejíž funkce dosud nebyla zjištěna, je specifická pro detekci sérotypu *S.* Enteritidis. Gen *sefA* je specifický pro *S.* Enteritidis. Pro detekci kmenů *Salmonella* ve vzorcích kuřete byla popsána metoda multiplex real-time PCR. Při detekci byly použity čtyři páry primerů komplementární k výše uvedeným oblastem genů. Detekční limit se pohyboval v rozmezí od 1 do 10 CFU · 25 g^{-1} vzorku [47].

Na základě sekvenčních dat poskytnutých databází GenBank byly sestrojeny nukleotidové sekvence primerů a značených sond pro detekci *Salmonella* metodou multiplex real-time PCR. Metoda byla popsána pro paralelní detekci *Salmonella* spp., zejména pak *S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis. Kromě 110 kmenů *Salmonella* bylo testováno ještě 18 kmenů jiných bakterií (např. *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica, Staphylococcus aureus* atd.). Metoda byla optimalizována na uměle zaočkovaných vzorcích vepřového a hovězího masa. Citlivost detekce pro *Salmonella* spp. a *S.* Typhimurium byla 100 % a 91,7 % pro *S.* Enteritidis. Specificita detekce pro *Salmonella* spp. and *S.* Typhimurium byla 100 % a pro *S.* Enteritidis 99,1 % [42].

4.2 Detekce *Escherichia coli*

Bakterie *E. coli* jsou součástí střevní mikroflóry teplokrevných živočichů. Patogenní *E. coli* jsou na rozdíl od nepatogenních vybaveny faktory virulence, které jsou zodpovědné za vyvolání onemocnění. Mezi faktory virulence je řazena produkce toxinů a schopnost adherence. Mezi nejnebezpečnější patogenní *E. coli* a potravinami přenášené patogeny vůbec je řazena *E. coli* O157:H7. Již velmi malé množství bakterie může být příčinou vzniku onemocnění spojeného s krvavými průjmy a bolestmi břicha, proto je *E. coli* O157:H7 řazena do kategorie biohazard 3. Častějším zdrojem je hovězí maso, ostatními zdroji jsou nepasterované mléko a džusy, růžičková kapusta, hlávkový salát a salámy. *E. coli* O157:H7 je velmi snadno přenosná z člověka na člověka a tak kontrola výskytu tohoto patogenu není snadná. Rychlá detekce je proto úspěšnou prevencí šíření tohoto infekčního sérotypu [40]. PCR detekce *E. coli* O157:H7 je založena na detekci genů, které jsou zodpovědné za faktory virulence. Jsou to geny *stx1* a *stx2*, kterými je kódována produkce verotoxinu a gen *eaeA*, který je spojován se schopností adherence [48]. Sekvencí genu *rfbO157* je kódován somatický antigen O157 *E. coli* a sekvencí genu *fliCH7* je kódován bičíkový antigen H7 *E. coli*. Tyto oblasti byly využity pro multiplex PCR detekci *E. coli* O157:H7 ze vzorků čerstvého ovčího mléka. Ve třech vzorcích byly detekovány produkty specifické pro *E. coli* O157:H7. Poté byla zkoumána patogenita bakterií *E. coli* O157:H7. Jako cílové oblasti byly tentokrát zvoleny sekvence genů odpovědných za patogenitu bakterie, sekvence genů *stx1*, *stx2*, *eaeA*, a *ehxA*, který je spojený s hemolytickou schopností. Metodou multiplex PCR byla ve všech případech prokázána přítomnost uvedených genů zodpovědných za patogenitu E. coli O157:H7 [49]. Gen *vt2* je zodpovědný za produkci verotoxinu, spolu s genem *eaeA* byl využit pro PCR detekci *E. coli* O157 ze vzorků hovězího masa. Ve třech vzorcích byla prokázána přítomnost *E. coli* O157. U této bakterie byla také prokázána produkce verotoxinu [50]. Sekvence genu *hly933* je spojována se schopností hemolýzi. Tento gen byl spolu s geny *fliCh7*, *stx* a *eaeA* využit pro multiplex PCR detekci *E. coli* O157:H7 a pro identifikaci H sérotypu a sérotypů produkujících verotoxin. Detekce byla provedena v obohacených vzorcích sekaného hovězího masa, sýra, mlžů, kapusty. Citlivost detekce byla menší než 1 CFU $\cdot$ g^{-1} vzorku [51].

4.3 Detekce ostatních potravinami přenášených patogenních bakterií

Campylobacter spp. jsou nejobvyklejšími původci gastroenteritid u lidí. Přes 90 % kampylobakterióz je vyvoláno druhy *C. jejuni* a *C. coli*. Mezi rizikové potraviny jsou řazeny zejména drůbeží maso, dále tmavá masa, mořské potraviny a čerstvé mléko [52]. Pro detekci *Campylobacter jejuni* ze vzorků potravin byla použita metoda real-time PCR. *Campylobacter jejuni* byl detekován v přirozeně i uměle kontaminovaných vzorcích syrového kuřecího masa, kuřecích drobů, korýšů a mléka. Při analýze byl použit obohacující krok, primery a fluorescenčně značená sonda byly sestrojeny pro cílovou ORF-C sekvenci. U tří testovaných vzorků byly získány falešně negativní výsledky. Bylo to vysvětleno možnou delší skladovací dobou extrakčních činidel nebo přítomností inhibitorů [53].

Druh *Clostridium perfringens* je rozdělen do šesti typů A-E v závislosti na produkci toxinů. Typ A produkuje enterotoxin a je spojován s potravinovými otravami, které se projevují průjmy a bolestmi břicha. Jeho zdrojem jsou především drůbeží maso a výrobky [54]. Byla popsána detekce enterotoxigenního *Clostridium perfringens* pomocí metody PCR. Kromě toho byl také zkoumán vliv různých složek potravin na citlivost PCR reakce. Mezi jeden z nejvýznamnějších inhibitorů reakce byl zařazen kolagen, který působí na aktivitu termostabilní DNA-polymerázy. Detekce byla provedena přímo bez obohacující procedury s cílovou oblastí *cpe* genu, kterým je kódována produkce enterotoxinu, a byly při ní použity vzorky čtyř druhů národních korejských jídel. Největší inhibiční efekt kolagenu byl zaznamenán u dušeného vepřového na víně, v tomto pokrmu nebylo stanoveno ani 10^5 CFU $\cdot$ g^{-1} [55].

Rod *Listeria* je tvořen několika druhy, z nichž patogenní je pouze druh *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* způsobuje vážné infekce krve, encefalitidu a meningitidu a to obzvláště u oslabených jedinců, těhotných žen a novorozenců. Listeriózy jsou spojené s konzumací kontaminované zeleniny, mléka a masných výrobků [56]. *Listeria monocytogenes* byla detekována pomocí metody PCR v uměle kontaminovaných vzorcích sýru a mletého masa. Byla popsána nová metoda extrakce DNA, principem této metody bylo alkoholové srážení v prostředí jodidu sodného. Kromě této metody byla DNA extrahována také povařením a fenolovou extrakcí. Pozitivní výsledek byl získán použitím nové extrakční metody, detekční limit reakce byl 10^3 CFU [57].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat amplifikační profil polymerázové řetězové reakce pro detekci *Salmonella* a *E. coli* a na jeho základě se pokusit detekovat tyto mikroorganizmy paralelně metodou multiplex PCR.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Přístrojová technika a pomůcky

autokláv 135 S, H+P VARIOKLAV- H+P Labortechnik AG, Německo

automatická mikropipeta- Nichiryo, Japonsko

běžné laboratorní sklo

centrifuga laboratorní chlazená 2300K- Hermle Labortechnik, Německo

chladnička ERB3046- Elektrolux, Švédsko

digitální váha KB800-2- Kern & Sohn GmbH, Německo

elektroforetická aparatura B1A- Thermo Scientific Owl Separation Systems, USA

eppendorfky- Neptune, USA

fotoaparát Power Shot G6- Canon, Japonsko

minikolonky a nástavce DNA Lego kit- Top-Bio s. r. o., Česká republika

Stomacher 001- Seward, Velká Británie

termoblok BIO TDB-100 Dry block thermostat- Biosan Ltd., Litva

termocykler BIO-RAD-PTC-200 DNA Engine cycler- MJ Research, USA

termostat biologický BT 120- Laboratorní přístroje Praha, Česká republika

UV-transluminátor # UC-4100- UltraLum Inc., USA

vortex BIO Vortex V1- Biosan Ltd., Litva

zdroj napětí MP3- 300N- Major Science, Taiwan

6.2 Chemikálie a reaktanty

agaróza (LE Agarose)- Cambrex Bio Science Rockland, Inc., USA

DNA Lego kit (DNA bind, DNA vazebný pufr, promývací pufr)- Top-Bio s. r. o., Česká republika

DNA Ladder (100 bp DNA Ladder)- BioLabs Inc., New England

dNTP mix / 12,5 mM (premix 12,5 mM dATP, dCTP, dGTP a dTTP)- Jena Bioscience GmbH, Německo

destilovaná voda- Ústav potravinářského inženýrství, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

etidiumbromid / 10 $mg \cdot ml^{-1}$- SERVA Electrophoresis GmbH, Německo

PCR pufr (10x ThermoPol Reaction Buffer)- BioLabs Inc., New England

primery- KRD,Česká republika (Tab. 1)

nanášecí pufr (Gel Loading Dye, Blue (6X))- BioLabs Inc., New England

Taq DNA-polymeráza (*Taq* DNA Polymerase with ThermoPol Buffer)- BioLabs Inc., New England

TBE pufr (TBE buffer 10x)- SERVA Electrophoresis GmbH, Německo

Tab. 1. Tabulka použitých primerů

primer	**sekvence**	**velikost PCR produktu**	**vymezená oblast**	**odkaz**
SAL-1F	5´-GTA GAA ATT CCC AGC GGG TAC TG-3´	438 bp	náhodně klonovaný fragment chromozomu *S.* Typhimurium	Waage, 1999 [58]
SAL-2R	5´-GTA TCC ATC TAG CCA ACC ATT GC-3´			
LZL-389	5´-ATG AAA GCT GGC TAC AGG AAG GCC-3´	264 bp	*lacZ* gen (aktivita ß-galaktosidázy)	Bej, 1991 [59]
LZR-653	5´-GGT TTA TGC AGC AAC GAG ACG TCA-3´			
V1S-F	5´-AAT TGA AGA GTT TGA TCA TG-3´	700 bp	$V_1 \rightarrow V_4$ oblasti genu pro 16S rRNA *E. coli*	Tsen, 1998 [60]
V3A-R	5´-CTC TAC GCA TTT CAC CGC TAC-3´			
P3mod-F	5´-ATT AGA TAC CCT GGT AGT CC-3´	700 bp	$V_5 \rightarrow V_9$ oblasti genu pro 16S rRNA *E. coli*	Tsen, 1998 [61]
P5-R	5´-GGT TAC CTT GTT ACG ACT TC-3´			

6.3 Kultivační média

6.3.1 MPA (masopeptonový agar)

Složení:	beef extract (masový výtažek)	3 g
	pepton	5 g
	NaCl	5 g
	destilovaná voda	1 l
	agar	15 g

Příprava: Jednotlivé složky byly rozpuštěny v destilované vodě. Poté bylo upraveno pH na 6,8 ± 0,2. Směs byla sterilována v autoklávu při teplotě 121 ˚C po dobu 20 minut a rozlita na Petriho misky.

6.3.2 BHI (brain heart infusion)

Složení:	BHI	37 g
	destilovaná voda	1 l

Příprava: Bylo naváženo 37 g BHI a rozpuštěno v destilované vodě. Půda byla sterilována při teplotě 121 ˚C po dobu 15 minut a rozlita do zkumavek.

6.3.3 BPW (buffered peptone water)

Složení:	BPW	20 g
	destilovaná voda	1 l

Příprava: BPW bylo rozpuštěno v destilované vodě a byla provedena úprava pH na hodnotu 7 ± 0,2. Následně byla provedena sterilace při teplotě 121 ˚C po dobu 20 minut. Tato tekutá půda byla uchována v zásobní lahvi.

Zde jsou uvedeni výrobci použitých komponent pro přípravu půd

agar (Type I)- HiMedia, Indie

beef extract- HiMedia, Indie

BHI- OXOID LTD., Velká Británie

BPW- BIO-RAD, Francie

pepton- HiMedia, Indie

NaCl- Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká republika

6.4 Bakteriální kmeny

V této práci byly použity 2 kmeny *Salmonella*, a to *Salmonella* Typhimurium 10 a *Salmonella* Typhimurium 352, a 3 kmeny *E. coli*, a to *E. coli* 17, *E. coli* Row a *E. coli* 1. Všechny kmeny kromě *E. coli* Row byly získány ze sbírky Ústavu potravinářského inženýrství, Fakulty technologické, Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Kmen *E. coli* Row byl získán z Biologického ústavu, Lékařské fakulty, Masarykovy univerzity v Brně.

6.5 Metody

6.5.1 Kultivace bakterií

Bakteriální kmeny byly kultivovány 24 hodin při 37 ˚C na MPA půdě.

6.5.2 Kultivace bakterií pro přípravu vzorků potravin

Bakteriální kmeny byly inkubovány 18 hodin při 37 ˚C v BHI médiu [61].

6.5.3 Příprava vzorků potravin

Byly použity vzorky kuřete zakoupené v podnikové prodejně (Raciola Jehlička). Z každého vzorku bylo sterilně do polyetylenového sáčku naváženo 10 g vzorku (kůže i masa) a uměle zaočkováno 1 ml narostlé bakteriální kultury. Nakonec bylo přidáno 90 ml pufrové peptonové vody. Vše bylo homogenizováno na Stomacheru 30 s. Z homogenizátu byl odebrán alikvotní podíl 1,5 ml a byl proveden 24 hodin dlouhý krok obohacení v pufrové peptonové vodě při 37 ˚C [61].

6.5.4 Extrakce DNA povařením

DNA byla extrahována z čistých bakteriálních kolonií narostlých na MPA půdě. DNA byla z bakteriálních buněk uvolněna lyzí využívající metodu povaření. Buňky z narostlých bakteriálních kolonií byly resuspendovány ve 100 µl 1x ředěného PCR pufru. Bakteriální suspenze byla vortexována a inkubována v termobloku 20 minut při 95 ˚C. Po povaření

byla provedena centrifugace při 12 000·g po dobu 3 minuty. Supernatant byl použit jako templát do PCR mixu.

6.5.5 Extrakce DNA pomocí Lego kitu

DNA z čistých bakteriálních kolonií byla resuspendována v 1 ml destilované vody. Z této suspenze byl odebrán alikvotní podíl 100 µl a byl smíchán s 200 µl vazebného pufru a inkubován 1 minutu. Do mikrokolonky s DNA bind partikulemi byl nanesen vzorek, který byl dvakrát promyt 1 ml promývacího pufru. Minikolonka byla umístěna do 1,5 ml eppendorfky a byla provedena centrifugace 2 minuty při 12 000·g k odstranění promývacího pufru. Poté byla minikolonka umístěna do nové 1,5 ml eppendorfky a bylo přidáno 50 µl elučního pufru, který byl předehřán na 50 ˚C. Kolonka byla opět stočena na centrifuze při 12 000·g, centrifugace trvala 1 minutu. DNA byla vymyta na dno zkumavky a byla použita jako templát do PCR mixu.

6.5.6 Extrakce DNA ze vzorků kuřete

Z každého vzorku byl odebrán alikvotní podíl 1 ml a byla provedena centrifugace 4 minuty/5000 g. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 1 ml 1x PCR pufru, vortexován 10 s a výsledná směs byla opět centrifugována, 4 minuty při 5000·g. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován ve 100 µl 1x PCR pufru a vortexován 10s. Vzorek byl umístěn do termobloku a inkubován 10 minut při 95 ˚C. Nakonec byla provedena centrifugace 20 s/5000 g. Takto upravený vzorek kuřete byl použit jako templát do PCR mixu [61].

6.5.7 PCR amplifikace

Byla provedena gradientová PCR amplifikace. Gradientovým programem bylo umožněno nastavit rozmezí annealingových teplot a ve stejném čase v jednom bloku termocykleru amplifikovat specifické sekvence DNA při použití různých amplifikačních teplot. Jedna reakce byla provedena v celkovém objemu 25 µl a složení reakčního mixu bylo následující**:**

2,5 µl 10x PCR pufru

0,5 µl dNTP mixu

0,25 µl primeru R a primeru F

0,1 µl *Taq* DNA-polymerázy

20,9 µl destilované vody

0,5 µl templátu DNA

6.5.8 Muliplex PCR amplifikace

Multiplex PCR byla provedena se dvěma páry primerů a byla rovněž gradientová. Jedna reakce byla provedena v celkovém objemu 25 µl a složení reakčního mixu bylo následující**:**

2,5 µl 10x PCR pufru

0,5 µl dNTP mixu

0,25 µl primeru R_1, primeru F_1, primeru R_2 a primeru F_2

0,1 µl *Taq* DNA-polymerázy

19,9 µl destilované vody

0,5 µl templátu DNA *Salmonella* a 0,5 µl templátu DNA *E. coli* nebo 1 µl templátu upraveného vzorku

6.5.9 Amplifikační profil

Amplifikační profil byl určen experimentálně a měl následující parametry; reakční cyklus byl zahájen počáteční tepelnou denaturací při 95 ˚C 5 minut, která byla následována 35 cykly amplifikace. Amplifikace byla složena z denaturace, annealingu a extenze. Denaturace probíhala při 95 ˚C 1 minutu. Annealingová teplota byla optimalizována pro jednotlivé detekce, časový údaj pro tento krok byl 1 minuta. Profil extenze byl 72 ˚C a 1 minuta. Reakce byla ukončena závěrečnou extenzí při 72 ˚C 3 minuty.

6.5.10 Elektroforetická detekce amplikonů

Amplifikované PCR produkty byly detekovány elektroforézou ve 2 % agarózovém gelu v prostředí 0,5x TBE pufru a vizualizovány pomocí UV-záření na transluminátoru. Agarózový gel byl barven etidiumbromidem, k 50 ml gelu byly přidány 3 µl etidiumbromidu. Pro elektroforézu bylo použito 12 µl vzorku, který obsahoval 10 µl amplifikovaného PCR produktu a 2 µl 6x nanášecího pufru. Pro posouzení velikosti

jednotlivých fragmentů byl použit 100 bp Marker. Elektroforetická separace trvala 40 minut při zvoleném napětí 75 V.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Salmonella a *Escherichia coli* patří mezi nejběžnější potravinami přenášené patogeny. Mohou vyvolat onemocnění a otravy, z nichž některé případy mohou končit i smrtí [40]. Včasná a rychlá detekce těchto rizikových patogenů je do jisté míry prevencí ochrany veřejného zdraví. Tradiční metody detekce vyžadují kultivační krok a jsou časově náročné. Naproti tomu metoda PCR, kterou lze *in vitro* amplifikovat a detekovat sekvenci DNA specifickou pro určitý mikroorganizmus, je rychlá a citlivá a také řeší problém malého množství cílové DNA ve vzorku potraviny [41, 42, 43].

Důležitým krokem před provedením vlastní PCR amplifikace je proces extrakce DNA. V této práci byla z čistých bakteriálních kultur DNA extrahována použitím komerční soupravy Lego kit z jednoho kmene *E. coli* a jednoho kmene *Salmonella* Typhimurium. Pro srovnání byla provedena metoda povaření bakteriálních buněk v PCR pufru, což je metoda méně časově i finančně náročná. Oběma metodami bylo získáno obdobné množství DNA, která byla navíc v dostačující čistotě pro PCR aplikace. Pro další experimenty již byla pro extrakci DNA využívána metoda povaření.

7.1 Detekce bakterie *Salmonella* Typhimurium

Pro detekci *Salmonella* bylo objeveno několik PCR metod, v nichž byly k amplifikaci použity různé cílové oblasti (sekvence genů *fimA, invA, sefA, aceK, fliC, sdf* a další) [41, 45, 46, 47].

V této práci byla pro detekci *Salmonella* zvolena jako cílová sekvence část oblasti chromozomu *Salmonella* Typhimurium LT2 JEO402-1 o velikosti 2,3 kb a k ní komplementární primery SAL-1F a SAl-2R. 2,3 kb fragment byl získán s využitím genové knihovny obsahující 6800 klonů chromozomu *Salmonella* Typhimurium LT2 metodou náhodného klonování [62]. Amplifikačni profil, který byl k detekci použit v předchozí studii [58], byl optimalizován; byla prodloužena fáze počáteční denaturace, byl zkrácen počet amplifikačních cyklů, denaturační teplota byla zvýšena a doba prodloužena, byla snížena annealingová teplota a byly zkráceny doby extenze i závěrečné extenze.

Experimentálně určený amplifikační profil byl použit pro všechny detekce uvedené v této práci, kromě annealingové teploty, která byla pro každou detekci optimalizována. Annealingová teplota byla nejdříve optimalizována pro detekci kmene *Salmonella*

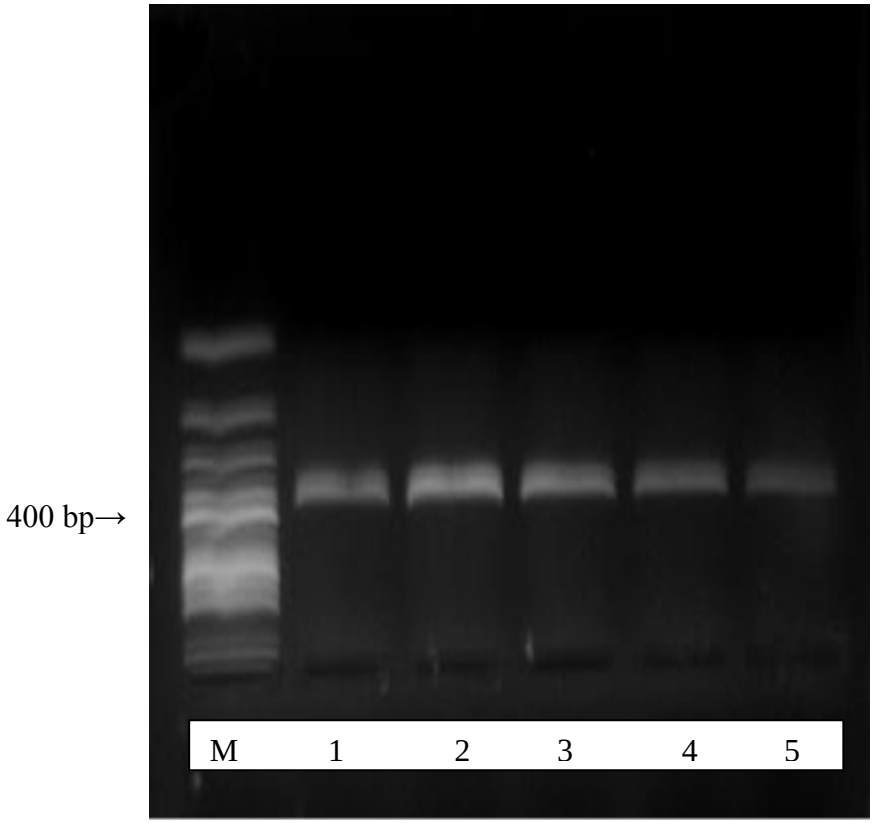
Typhimurium 10, a to v rozmezí 55,2 ˚C až 60,2 ˚C. Byl sledován vliv annealingové teploty na výsledek detekce. Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce 2. Detekce byla úspěšná při použití rozmezí annealingových teplot od 56,3 do 57,2 ˚C. Při použití annealingové teploty 55,2 ˚C byl výsledek detekce negativní, při použití vyšších annealingových teplot byly výsledky pouze slabě pozitivní nebo negativní. Na základě této optimalizace byla provedena detekce *Salmonella* Typhimurium 352. Vliv annealingové teploty na výsledek detekce *Salmonella* Typhimurium 352 je uveden v Tabulce 2. Pro detekci bylo určeno optimum annealingové teploty od 56 ˚C do 56,6 ˚C. Při použití vyšších annealingových teplot byly výsledky detekce negativní.

Tab. 2. Výsledky detekce Salmonella při různých annealingových teplotách

***Salmonella* Typhimurium 10**		***Salmonella* Typhimurium352**	
annealingová teplota (˚C)	výsledek detekce	annealingová teplota (˚C)	výsledek detekce
55,2	–	56,0	+
56,3	+	56,6	+
56,6	+	57,0	–
56,6	–	57,6	–
56,8	+	58,6	-
56,9	+		
56,9	+		
57,2	+		
57,2	+S		
57,5	+S		
57,5	–		
57,7	+S		
60,2	–		

S- slabá koncentrace PCR produktu

Byl detekován produkt o přibližné velikosti 400 bp (Obr. 1) u obou použitých kmenů *Salmonella* Typhimurium. Tato velikost odpovídala délce primery vymezené sekvence (438 bp) [58]. Byla potvrzena přítomnost bakterií *Salmonella* Typhimurium.



Obr. 1. Elektroforetický agarózový gel PCR produktů získaných při detekci Salmonella Typhimurium

M- 100 bp DNA marker

1- *S*. Typhimurium 10 při T_A= 56,3 ˚C

2- *S*. Typhimurium 10 při T_A= 56,6 ˚C

3- *S*. Typhimurium 10 při T_A= 56,9 ˚C

4- *S*. Typhimurium 352 při T_A= 56,0 ˚C

5- *S*. Typhimurium 352 při T_A= 56,6 ˚C

Oblast JEO402-1 je velmi specifická pro detekci bakterie *Salmonella*. Primery SAL-1F a SAL-2R, které jsou komplementární k části této oblasti, byly použity při testování 129 kmenů *Salmonella* a 31 jiných bakteriálních kmenů. Pro všechny bakteriální kmeny jiné než *Salmonella* nebyl detekován žádný specifický produkt. Ze 129 testovaných kmenů *Salmonella* byly negativní výsledky získány pouze detekcí jednoho kmene *Salmonella enterica arizonae* a tří kmenů *Salmonella enterica diarizonae* [58].

Oblast JEO402-1 *Salmonella* byla detekována také metodou hybridizace. Bylo testováno 396 kmenů *Salmonella* ze subspecií I až VI a 178 kmenů jiných bakterií z čeledi

Enterobacteriaceae. U všech 178 kmenů jiných než *Salmonella* nevyšla rovněž pozitivní detekce [63].

7.2 Detekce bakterie *Escherichia coli*

Molekulární metody pro detekci *E. coli* v potravinách a ve vodě jsou soustředěny na detekci cílových sekvencí genů *lacZ, lamB, uid genů* [59] a *malB* operonu [64].

V této práci byla bakterie *E. coli* detekována metodou PCR a k její detekci byly využity tři páry primerů. Jedním párem primerů byla vymezena sekvence *lacZ* genu *E. coli* (LZL-389, LZR-653) [59], ostatními primery byla vymezena V oblast genu pro 16S rRNA *E. coli* (V1S-F a V3A-R a P3mod-F a P5-R) [60]. Všechny tři páry primerů byly testovány na kmeni *E. coli* 17, což je izolát z kůže chlazené drůbeže. Na rozdíl od předcházející studie [59] byla v amplifikačním profilu prodloužena doba počáteční denaturace, byla zvýšena teplota denaturace a byla snížena annealingová teplota. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3.

Pro detekci *E. coli* 17 byly nejlepší výsledky získány při použití primerů LZL-389 a LZL-653. Na základě získaných výsledků byla pro detekci *E. coli* 17 určena dvě rozmezí optimálních annealingových teplot, 54,2 ˚C až 54,9 ˚C a 56,3 ˚C až 56,9 ˚C.

Při použití primerů V1S-F a V3A-R při různých annealingových teplotách byla v této práci detekce ve dvou případech neúspěšná, ve dvou případech byly specifické PCR produkty doprovázené nespecifickými PCR produkty a pouze v jednom případě při teplotě 55,2 ˚C byla *E. coli* 17 detekována úspěšně. Při použití primerů P3mod-F a P5-R byly při různých annealingových teplotách ve čtyřech případech získány negativní výsledky, jednou byl specifický PCR produkt doprovázen nespecifickými a pouze při teplotě 57,2 ˚C byla detekce úspěšná.

Oblast *lacZ* genu je využívána také pro detekci ostatních koliformních bakterií. Pozitivní výsledky byly získány také při detekci *Shigella flexneri, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae*. Negativní výsledky byly získány při detekci *Salmonella* [65]. Detekce *E. coli* pomocí primerů LZL-389 a LZR-653 byla popsána také Frickerem *et al.* [66]. Bylo testováno 441 kmenů bakterií, z nichž bylo 117 kmenů *E. coli*. Všechny kmeny *E. coli* byly detekovány úspěšně [66].

Tab. 3. Výsledky detekce E. coli 17 *při použití různých primerů a různých annealingových teplot*

***E. coli* 17 (LZL-389, LZR-653)**		***E. coli* 17 (V1S-F, V3A-R)**		***E. coli* 17 (P3mod-F, P5-R)**	
annaeal. teplota (˚C)	výsledek detekce	annaeal. teplota (˚C)	výsledek detekce	annaeal. teplota (˚C)	výsledek detekce
52,0	+NP	55,0	–	55,0	–
53,3	+NP	55,2	+	55,0	–
53,6	+	57,2	+NP	55,2	–
53,9	+	57,2	+NP	57,2	+
54,0	+	60,2	–	57,2	+NP
54,2	+			60,2	–
54,3	+				
54,5	+				
54,5	+NP				
54,7	+				
54,9	+				
55,0	–				
55,5	–				
56,3	+				
56,6	+				
56,9	+				
57,5	+S				
60,2	–				
62,0	–				

S- slabá koncentrace PCR produktu

NP- také přítomnost nespecifických produktů o různé velikosti

Pro detekci dalších dvou kmenů *E. coli* byly v této práci tedy použity primery LZL-389 a LZR-653. Protože cílem diplomové práce bylo také aplikovat metodu multiplex PCR pro paralelní detekci *Salmonella* a *E. coli*, bylo pro detekci ostatních kmenů *E. coli* zvoleno rozmezí annealingových teplot 56,3 ˚C až 56,9 ˚C, které se blíží rozmezí annealingových teplot pro detekci bakterie *Salmonella*. Pro metodu multiplex PCR je totiž důležité, aby teplota pro připojení primerů byla podobná (přesto optimální) u všech použitých párů

primerů [67]. Vliv annealingové teploty na detekci *E. coli* Row a *E. coli* 1 je uveden v Tabulce 4.

Tab. 4. Výsledky detekce E. coli při různých annealingových teplotách

***E. coli* Row**		***E. coli* 1**	
annealing. teplota (˚C)	výsledek detekce	annealing. teplota (˚C)	výsledek detekce
56,0	+S	56,1	+
56,2	+S	56,3	+
56,3	+	56,6	–
56,6	+	56,9	–
56,9	+	57,2	–
57,2	–	57,5	–
57,5	–	57,9	–
		58,2	–
		58,5	+

S- slabá koncentrace PCR produktu

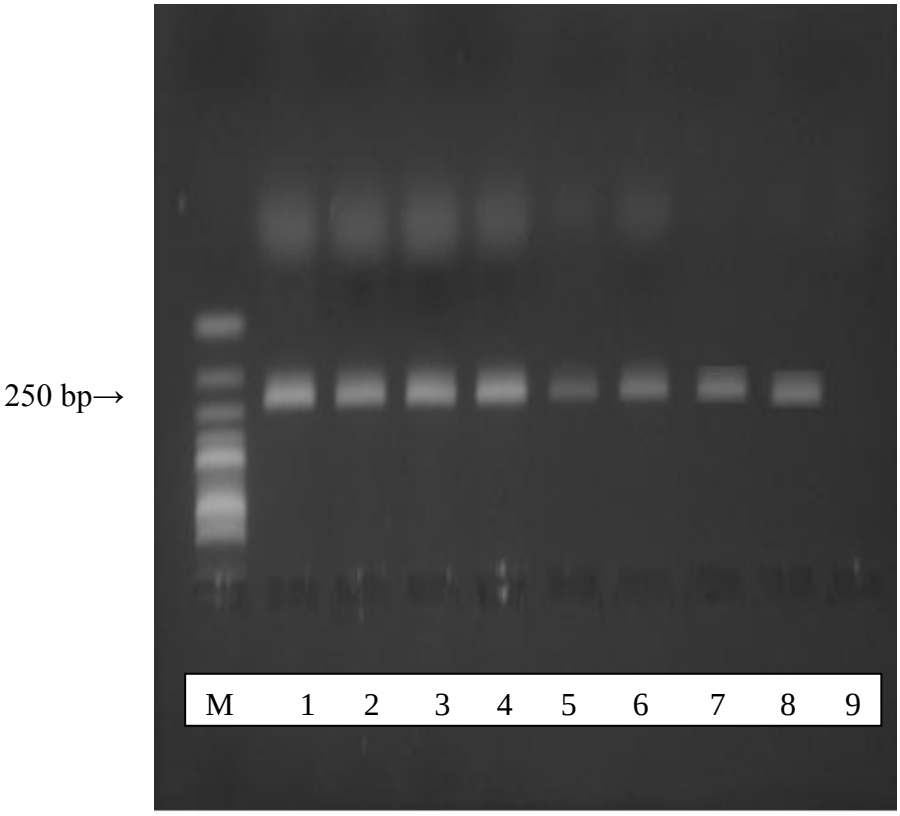
Nejlepší výsledky pro detekci *E. coli* Row byly dosaženy při použití annealingové teploty 56,3 ˚C, 56,6 ˚C, 56,9 ˚C. Při použitích vyšších annealingových teplot nebyla detekce úspěšná a také použití nižších annealingových teplot nebylo úplně vhodné, jelikož PCR produkty byly slabé koncentrace. Pro detekci *E. coli* 1 byly optimální annealingové teploty 56,1 ˚C a 56,3 ˚C. Při použití vyšších annealingových teplot byly výsledky negativní, pouze při použití annealingové teploty 58,5 ˚C byl detekován specifický amplikon.

Teplota pro připojení primerů je volena asi o 5 ˚C menší než teplota tání primerů. Při použití nízké annealingové teploty dochází k amplifikaci nejenom specifických DNA fragmentů a na agarózovém gelu je vizualizováno mnoho bandů. Naopak, když je zvolena vysoká annealingová teplota, dochází ke snížení koncentrace očekávaných produktů [68].

Teplota 58,5 ˚C se blíží teplotě tání primerů a je možné, že použitím vyšších annealingových teplot by bylo získáno další teplotní optimum vhodné pro připojení primerů. Toto tvrzení bylo potvrzeno ve studii Beje *et al*. [65], ve které byla *E. coli*

úspěšně detekována za použití primerů shodných s výše popsaným párem primerů při použití annealingové teploty 60 ˚C [65].

U všech tří kmenů *E. coli* byl detekován amplikon o přibližné velikosti 250 bp, jehož velikost odpovídala velikosti sekvence vymezené primery (264 bp) [59]. Byla detekována *E. coli*. Na Obrázku 2 jsou ukázány amplikony tří detekovaných kmenů *E. coli*.



Obr. 2. Elektroforetický agarózový gel PCR produktů získaných při detekci E. coli

M- 100 bp DNA marker,

1- *E. coli* 17 při T_A= 56,3 ˚C

2- *E. coli* 17 při T_A= 56,6 ˚C

3- *E. coli* 17 při T_A= 56,9 ˚C

4- *E. coli* Row při T_A= 56,3 ˚C

5- *E. coli* Row při T_A= 56,6 ˚C

6- *E. coli* Row při T_A= 56,9 ˚C

7- *E. coli* 1 při T_A= 56,1 ˚C

8- *E. coli* 1 při T_A= 56,3 ˚C

9- *E. coli* 1 při T_A= 56,6 ˚C

7.3 Muliplex PCR

Metodou multiplex PCR je možno analyzovat více různých vzorků DNA najednou či sledovat více genů v jednom vzorku [8]. Dochází tedy ke zkrácení času pro přípravu PCR mixu a také jsou ušetřeny náklady na reakční komponenty. Aplikací metody multiplex PCR mohou být také odhaleny falešně negativní výsledky, protože každý vzniklý amplikon poskytuje interní kontrolu pro ostatní amplifikované fragmenty. Kromě toho je umožněno sledovat množství a kvalitu jednotlivých templátů. Pro tyto výhody bylo mnoho tradičních PCR metod upraveno pro multiplex PCR amplifikaci [67].

Pro použití metody multiplex PCR je důležité, aby annealingové teploty všech použitých primerů byly podobné, a aby velikosti jednotlivých PCR produktů byly odlišitelné [67, 69]. V našem případě byly obě podmínky splněny, a proto byla provedena paralelní detekce *Salmonella* a *E. coli*.

Na základě získaných výsledků byla ve stejném čase sledována přítomnost náhodně klonovaného fragmentu specifického pro *Salmonella* a genu *lacZ* specifického pro *E. coli*. Optimalizace annealingové teploty byla provedena s kmeny *Salmonella* Typhimurium 10 a *E. coli* 17 v rozmezí od 55,7 ˚C a 57,5 ˚C. Paralelní detekce byla nejúspěšnější při použití annealingových teplot 56,6 C˚ a 56,8 ˚C. Proto bylo pro ostatní multiplex PCR detekce kmenů *Salmonella* Typhimurium 10 a *E. coli* zvoleno rozmezí annealingových teplot blízké těmto hodnotám. Na základě získaných výsledků byla jako nejvhodnější annealingová teplota určena hodnota 56,6 ˚C. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 5.

Pro paralení detekci *Salmonella* Typhimurium 352 a kmenů *E. coli* bylo na základě předchozích výsledků zvoleno rozmezí annealingových teplot od 56 ˚C do 56,6 ˚C. Pro detekci *Salmonella* Typhimurium 352 a kmenů E. coli 17 a Row byla nejvhodnější annealingová teplota 56 ˚C a pro detekci *Salmonella* Typhimurium 352 a kmenu *E. coli* 1 annealingová teplota 56,1 ˚C. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 6. Na Obrázku 3 jsou zaznamenány pozitivní výsledky získané metodou multiplex PCR.

Tab. 5. Výsledky multiplex PCR detekce kmene S. Typhimurium 10 v kombinaci s kmeny E. coli při různých annealingových teplotách

***Salmonella* Typhimurium 10, *E. coli* 17**		***Salmonella* Typhimurium 10, *E. coli* Row**		***Salmonella* Typhimurium 10, *E. coli* 1**	
annealing. teplota (˚C)	výsledek detekce	annealing. teplota (˚C)	výsledek detekce	annealing. teplota (˚C)	výsledek detekce
55,7	– –	56,3	– –	56,3	– +
56,3	– –	56,3	– +	56,6	– –
56,3	– +S	56,3	– +	56,6	+ +
56,6	– +	56,6	+ +	56,6	+ +
56,6	+ +	56,6	+ +	56,9	+ +
56,6	+ +	56,9	+ +	56,9	– –
56,8	+ +	56,9	– +S	57,2	– –
56,9	+ +	57,2	– –	57,5	– –
56,9	– +	57,5	– –		
56,9	– –				
56,9	– –				
57,2	– +				
57,2	– –				
57,5	– –				

první v pořadí je uveden produkt specifický pro *Salmonella*

S- slabá koncentrace PCR produktu

Tab. 6. Výsledky multiplex PCR detekce kmene S. Typhimurium 352 v kombinaci s kmeny E. coli při různých annealingových teplotách

***S.* Typhimurium 352, *E. coli* 17**		***S.* Typhimurium 352, *E. coli* Row**		***S.* Typhimurium 352, *E. coli* 1**	
annealing. teplota (˚C)	výsledek detekce	annealing. teplota (˚C)	výsledek detekce	annealing. teplota (˚C)	výsledek detekce
56,0	+ –S	56,0	++	56,0	– +
56,0	+ +	56,0	++	56,1	– +

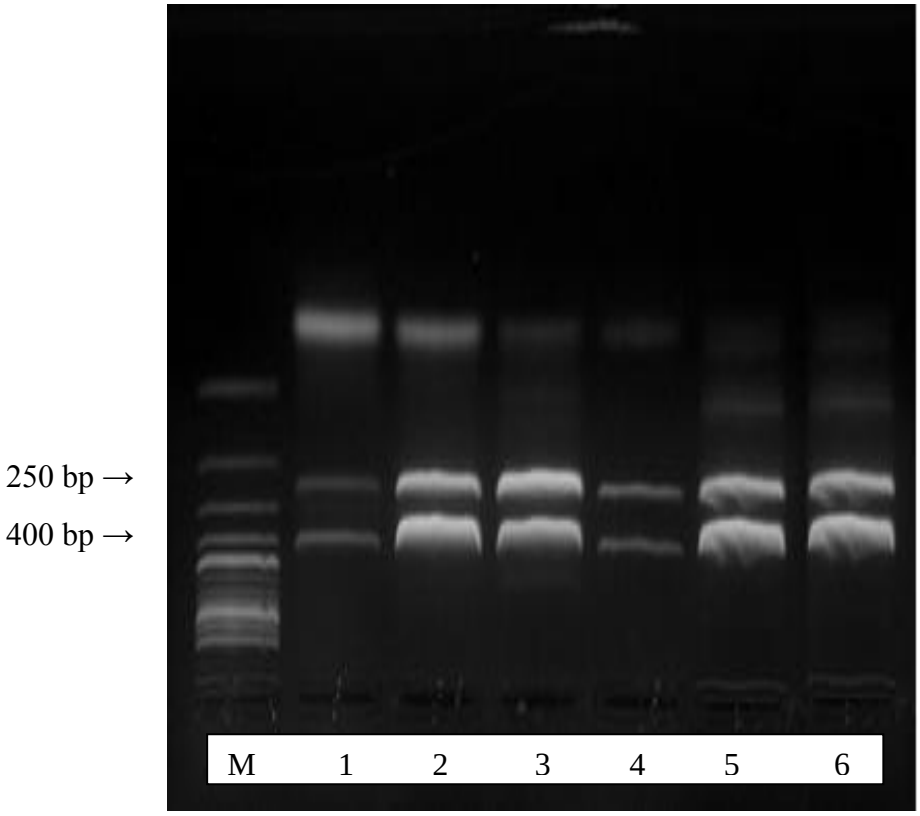
Pokračování Tab. 6.

***S.* Typhimurium 352, *E. coli* 17**		***S.* Typhimurium 352, *E. coli* Row**		***S.* Typhimurium 352, *E. coli* 1**	
annealing. teplota (˚C)	výsledek detekce	annealing. teplota (˚C)	výsledek detekce	annealing. teplota (˚C)	výsledek detekce
56,2	– +	56,2	– +S	56,1	++
56,3	– +	56,3	+ +S	56,2	++S
56,3	– +	56,3	– +S	56,3	++S
56,6	– +	56,6	– +S	56,3	– +
56,6	– –	56,6	– +S	56,6	– –

první v pořadí je uveden výsledek detekce pro *Salmonella*

S- slabá koncentrace PCR produktu

Fratamico *et al*. [70] popsali metodu multiplex PCR pro paralelní detekci *E. coli* O157:H7 a *Salmonella* spp. Při detekci byly použity čtyři páry primerů. Primery byly vymezeny oblasti genů *eaeA*, *stx*, *invA* a sekvence plazmidu *E. coli* O157:H7. Gen *eaeA* je spojován se schopností adherence *E. coli*, v genech *stx* je zakódována produkce verotoxinu *E. coli*, genem *invA* je kódována struktura proteinu spojeného s virulencí *Salmonella*. Detekce byla úspěšně provedena v uměle zaočkovaných vzorcích jablečného moštu, hovězího masa, sekané a fekáliích skotu [70].



Obr. 3. Elektroforetický agarózový gel PCR produktů získaných při paralelní detekci Salmonella a E. coli

M- 100 bp DNA marker

1- *S.* Typhimurium 10 a *E. coli* 17 při T_A= 56,6 ˚C

2- *S.* Typhimurium 10 a *E.* coli Row při T_A= 56,6 ˚C

3- *S.* Typhimurium 10 a *E. coli* 1 při T_A= 56,6 ˚C

4- *S.* Typhimurium 352 a *E. coli* 17 při T_A= 56,0 ˚C

5- *S.* Typhimurium 352 a *E. coli* Row při T_A= 56,0 ˚C

6- *S.* Typhimurium 352 a *E. coli* 1 při T_A= 56,1 ˚C

7.4 Použití multiplex PCR při detekci *Salmonella* Typhimurium a *E. coli* z kuřecího masa

Metody PCR pro detekci *Salmonella* byly popsány pro různé vzorky potravin, jako např. rybí maso [71], masné produkty [71, 72, 73], kuřecí kůže [74], vejce [75], mléčné produkty [76] atd. *E. coli* byla metodami PCR detekována např. ve vzorcích hovězího masa [50, 51], zeleniny [51] a nepasterovaného mléka [49].

V této práci byla zkušebně provedena detekce *Salmonella* a *E. coli* metodou multiplex PCR ze vzorků kuřete, masa i kůže. Postup úpravy vzorků a metoda extrakce DNA byly převzaty ze studie publikované dos Santosovou *et al.* v roce 2001 [61]. Amplifikační profil byl stanoven na základě výsledků získaných v této práci. Parametry amplifikačního profilu jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tab. 7. Amplifikační profil pro detekci Salmonella a E. coli

reakční krok	**teplota**	**doba**
počáteční denaturace	95 ˚C	5 minut
denaturace	95 ˚C	1 minuta
annealing	*	1 minuta
extenze	72 ˚C	1 minuta
závěrečná extenze	72 ˚C	3 minuty
počet amplifikačních cyklů		35

* *S.* Typhimurium 10 a *E. coli* 17 56,6 ˚C
S. Typhimurium 10 a *E. coli* Row 56,6 ˚C
S. Typhimurium 10 a *E. coli* 1 56,6 ˚C
S. 352 a *E. coli* 17 56,0 ˚C
S. 352 a *E. coli* Row 56,0 ˚C
S. 352 a *E. coli* 1 56,1 ˚C

Detekce byla provedena v uměle zaočkovaných vzorcích. Umělým zaočkováním vzorků je ověřováno, zda použitý detekční postup může být úspěšně aplikován také pro detekci mikroorganizmů z reálných vzorků.

Velkým problémem, který při aplikaci metody PCR na vzorky potravin může nastat, je vznik falešně negativních výsledků, které jsou vyvolány přítomností různých složek potravin [38, 55]. Tyto složky mohou inhibovat extrakci nukleových kyselin nebo jejich amplifikaci. Dochází tak k tomu, že jsou získány negativní výsledky, i když jsou mikroorganizmy ve vzorku potraviny přítomny. Důležitým krokem je tedy extrakce DNA. V této práci byla k extrakci DNA ze vzorků kuřete použita metoda povaření v PCR pufru.

Detekce byla nejdříve provedena ve čtyřech upravených vzorcích kuřecího masa a kůže, do kterých byly zaočkovány kmeny *S.* Typhimurium 10 spolu s *E. coli* 17 nebo *E. coli* 1. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 8. V žádném případě se nepodařilo detekovat oba specifické amplikony, pouze při teplotě 56,6 ˚C a 56,9 ˚C byla detekována *E. coli* 17.

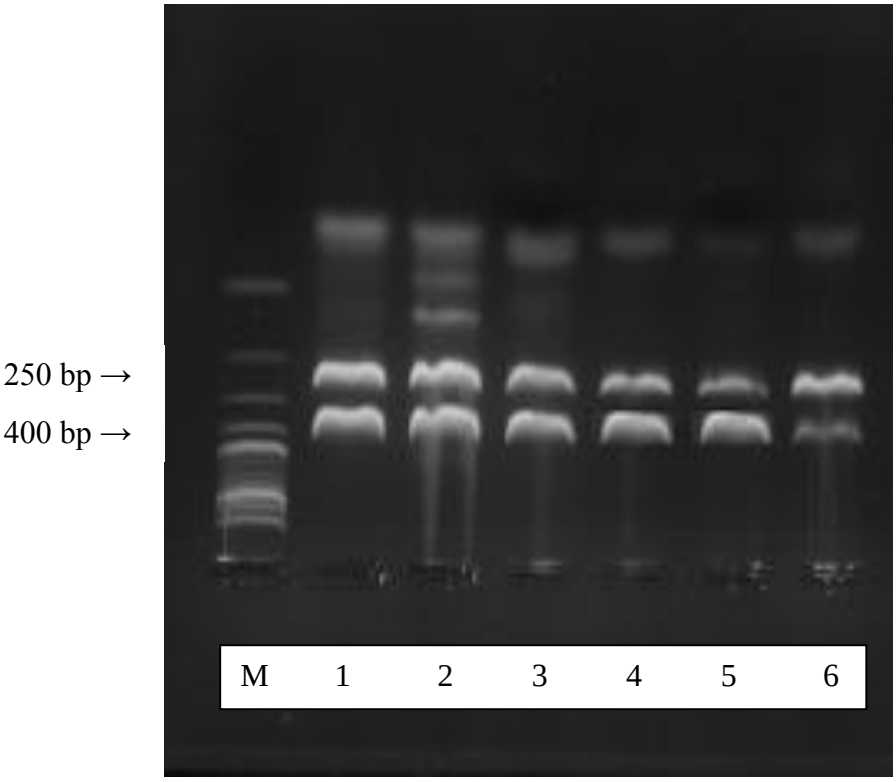
Tab. 8. Výsledky multiplex PCR detekce vybraných kmenů Salmonella a E. coli ze vzorků kuřete

bakterie	**annealingová teplota (˚C)**	**výsledek detekce**
S. Typhimurium 10 a *E. coli* 17	56,6	– +
S. Typhimurium 10 a *E. coli* 17	56,9	– +
S. Typhimurium 10 a *E. coli* 1	56,6	– –
S. Typhimurium 10 a *E. coli* 1	56,9	– –

první v pořadí je uveden výsledek detekce pro *Salmonella*

Protože byly detekovány alespoň nějaké specifické PCR produkty, byl uvedený postup použit pro další multiplex PCR detekci. Tentokrát byly metodou multiplex PCR ze vzorků kuřete úspěšně detekovány všechny uvedené kmeny *Salmonella* a *E. coli*. Bylo by ovšem ještě nutné ověřit zda by uvedený postup fungoval za stejných podmínek vždy. Výsledky detekce jsou uvedeny na Obrázku 4.

Na základě získaných výsledků by metoda extrakce DNA povařením mohla být s úspěchem aplikována na vzorky, ve kterých je jako ve vzorcích kuřete převážně zastoupena bílkovinná složka, krev a tuk, kdy inhibiční aktivita těchto složek je dostatečně eliminována právě povařením.



Obr. 4. Elektroforetický agarózový gel amplikonů Salmonella a E. coli detekovaných ve vzorcích kuřat

M- 100 bp DNA marker

1- *S.* Typhimurium 10 a *E. coli* 17 při T_A= 56,6 ˚C

2- *S.* Typhimurium 10 a *E.* coli Row při T_A= 56,6 ˚C

3- *S.* Typhimurium 10 a *E. coli* 1 při T_A= 56,6 ˚C

4- *S.* Typhimurium 352 a *E. coli* 17 při T_A= 56 ˚C

5- *S.* Typhimurium 352 a *E. coli* Row při T_A= 56 ˚C

6- *S.* Typhimurium 352 a *E. coli* 1 při T_A= 56,1 ˚C

ZÁVĚR

Nejznámější a nejvíce používanou metodou molekulární biologie je metoda PCR a její modifikace jako nested PCR, multiplex PCR nebo real-time PCR. Podstatou PCR je amplifikace vybrané sekvence deoxyribonukleové kyseliny, ve které jsou zakódovány specifické vlastnosti mikroorganizmu, který má být detekován. Použitím metody PCR je tak překonávána i další překážka při detekci, a to malý počet mikroorganizmů ve vzorku. Metody PCR mohou být s úspěchem použity pro detekci patogenů ze vzorků vody, potravin a také klinických vzorků.

Cílem této práce bylo optimalizovat metodu PCR pro detekci *Salmonella* a *E. coli* a metodu multiplex PCR pro paralelní detekci těchto bakterií. V této práci byla pro detekci *Salmonella* Typhimurium využita část oblasti chromozomu *Salmonella* Typhimurium LT2 o velikosti 438 bp. Pro detekci *E. coli* byla využita 264 bp dlouhá sekvence genu *lacZ*, který je specifický pro aktivitu ß-galaktosidázy. Pro detekci *Salmonella* byly použity primery SAL-1F a SAL-2R a pro detekci *E. coli* primery LZL-389 a LZR-653.

Pro připojení primerů je důležitá vhodná teplota. Annealingová teplota byla optimalizována pro jednotlivé detekce provedené v této práci. Optimální annealingová rozmezí se pohybovala od 56 ˚C do 57,2 ˚C v závislosti na použitém bakteriálním kmenu.

Pro detekci *Salmonella* a *E. coli* byla nalezena optimální rozmezí annealingových teplot. Jelikož při jednotlivých detekcích byla získána podobná rozmezí annealingových teplot a velikosti PCR produktů byly odlišitelné, mohla být provedena detekce *Salmonella* a *E. coli* paralelně metodou multiplex PCR. Touto metodou byly úspěšně detekovány oba kmeny *Salmonella* Typhimurium v kombinaci se třemi kmeny *E. coli*.

Tato optimalizovaná metoda byla použita pro detekci bakterií *Salmonella* a *E. coli* z uměle zaočkovaných vzorků kuřecí kůže a kuřecího masa. Postup úpravy vzorku a metoda extrakce DNA povařením byly převzaty z dříve provedené studie a postup pro PCR byl získán na základě výsledků v této práci. Paralelní detekce byla úspěšná pro všechny kombinace kmenů *Salmonella* a *E. coli*.

Aby tento postup mohl být úspěšně aplikován také na reálné vzorky kuřecího masa a kůže popř. dalších potravin, bylo by nutné ještě ověřit, zda uvedená metoda dává pozitivní výsledky při detekci dalších kmenů *Salmonella* a *E. coli* a zda nedetekuje kmeny jiné než *Salmonella* a *E. coli*.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 1999 - 2008- absolutně* [online]. 2008 [cit. 2009-05-15]. Dostupný z WWW: <http://www.szu.cz/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-absolutne>.

[2] VAŘEJKA, František, MRÁZ, Oldřich, SMOLA, Jiří. *Speciální veterinární mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989. 258 s. ISBN 80-209-0042-X.

[3] *Salmonella* [online]. 2006 [cit. 2009-03-01]. Dostupný z WWW: <http://biomikro.vscht.cz/trp/documents/potrmik/Potravinarskepatogeny.pdf>.

[4] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.

[5] KRMENČÍK, Pavel, KYSILKA, Jiří. *Toxikon: E. coli* [online]. 2001 [cit. 2009-03-01]. Dostupný z WWW: <http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/escherichia_coli.php>.

[6] VOTAVA, Miroslav et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

[7] KARMALI, Mohamed, A. Infection by verocytotoxin-producing Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1989, no. 1 [cit. 2009-04-23]. Dostupný z WWW: <http://cmr.asm.org/cgi/content/short/2/1/15>.

[8] ČERMÁK, Pavel. *Klinická mikrobiologie- gastriontestinální a sexuálně přenosné infekce* [online]. 2007 [cit. 2009-03-02]. Dostupný z WWW: <http://ukb.lf1.cuni.cz/ppt/cermak/klinicka_mikrobiologie-GIT_listeriove_a_STD_infekce.pdf>.

[9] KOČÁREK, Eduard. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2004. 211 s. ISBN 80-7183-326-6.

[10] MILLAR, B. C., XU, J., MOORE, J. E. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Curent Issues in Molecular Biology* [online]. 2007, no. 9 [cit. 2009-03-02]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.

[11] TANG, Y. W., PROCOP, G. W., PERSING, D. H. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clinical Chemistry* [online]. 1997, no. 43 [cit. 2009-03-02]. Dostupný z WWW: <http://www.clinchem.org/cgi/content/full/43/11/2021>.

[12] DeLONG, E. F., WICKHAM, G. S., PACE, N. R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* [online]. 1989, no. 245 [cit. 2009-03-02]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466341?ordinalpos=1296&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum>.

[13] *Molekulární genetika I* [online]. 2008 [cit. 2009-02-21]. Dostupný z WWW: <http://biologie.upol.cz/download/BIO-VCA11_BIO VCB11/praktika/navody/archiv/VCB1_08_11c_Molekularni_genetika.pdf>.

[14] *DNA- DNA hybridizace* [online]. 2006 [cit. 2009-02-21]. Dostupný z WWW: <http://www.biology.estranky.cz/clanky/genetika/dna-dna-hybridizace>.

[15] PRŮŠA, Richard, LÁNY, Jan, VEJVALKA, Jan et al. *Multimediální učebnice DNA diagnostiky: hybridizační metody* [online]. 1998 [cit. 2009-02-21]. Dostupný z WWW: <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa4.htm>.

[16] ROSYPAL, Stanislav et al. *Úvod do molekulární biologie: Molekulární biologie virů, priony, vznik života, molekulární evoluce, metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie* 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2002. 1172 s. ISBN 8090256244.

[17] PAZLAROVÁ, Jarmila. Pokračování kultivačních metod [online]. 2009 [cit. 2009-05-10]. Dostupný z WWW: <http://biomikro.vscht.cz/documents/potrmik/2009/Pokracovani_kultivacnich_metod.pdf>.

[18] *Izolace nukleových kyselin* [online]. 2006 [cit. 2009-03-04]. Dostupný z WWW: <http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf>.

[19] PAVLÍK, Emil. *Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 3* [online]. 2005 [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW: <http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>.

[20] *Restriction fragment length polymorphism (RFLP)* [online]. 1993 [cit. 2009-02-22]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>.

[21] *Restriction enzymes explained* [online]. 2005 [cit. 2009-02-22]. Dostupný z WWW: <http://biotech.about.com/od/proteinengineering/a/restrictenz.htm>.

[22] Restriction enzyme [online]. 2001 [cit. 2009-02-22]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Restriction_enzyme>.

[23] ŠTORCHOVÁ, H. *Metody analýzy DNA v botanice* [online]. 2001 [cit. 2009-02-22]. Dostupný z WWW: <*www.ueb.cas.cz/download/manual.rtf*>.

[24] ROMPRÉ, A. et al. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of microbiological methods* [online]. 2002, no. 49 [cit. 2006-05-10]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777581?ordinalpos=7&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum>.

[25] ZEIDAN, Henry M., DASHEK, Wiliam V. *Experimental approaches in biochemistry and molecular biology*. Dabuque: Wm. C. Brown. 219 s. ISBN 0697167356.

[26] TONAR, Zbyněk. *Polyklonální protilátky* [online]. 2002 [cit. 2009-02-26]. Dostupný z WWW: <http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node13.html>.

[27] TONAR, Zbyněk. Monoklonální protilátky [online]. 2002 [cit. 2009-02-26]. Dostupný z WWW: <http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node14.html>.

[28] *Immunoassay* [online]. 2001 [cit. 2009-02-24]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Immunoassay>.

[29] *Introduction to Immunoassays* [online]. 2004 [cit. 2009-02-25]. Dostupný z WWW: <http://www.abbottdiagnostics.com/science/pdf/learning_immunoassay_01.pdf>.

[30] KOPECKÝ, Jan. *Interakce antigenu s protilátkou* [online]. 2004 [cit. 2009-02-25]. Dostupný z WWW: <*rum.bf.jcu.cz/public/kopecky/04/04_Interakce.doc*>.

[31] RUML, Tomáš, RUMLOVÁ Michaela, PAČES, Václav. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.

[32] KUČERA, Tomáš. *Metody molekulární biologie* [online]. 2006 [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW: <http://www.kbi.zcu.cz/studium/ftp/mobi10.pdf>.

[33] *DNA polymerázy a pufry* [online]. [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW: <http://www.top-bio.cz/kat-info.asp?kat=1>.

[34] *Polymerázová řetězová reakce* [online]. 2008 [cit. 2009-03-04]. Dostupný z WWW: <http://wiki.lf1.cuni.cz/index.php/Polymerasov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce#Primery>.

[35] RACLAVSKÝ, Vladislav. *Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)* [online]. 2003 [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW: <http://biologie.upol.cz/metody/Amplifikace%20pomoci%20PCR.htm>.

[36] *Elektroforéza nukleových kyselin* [online]. 2008 [cit. 2009-03-04]. Dostupný z WWW: <http://wiki.lf1.cuni.cz/index.php/Elektrofor%C3%A9za_nukleov%C3%BDch_kyselin>.

[37] PERSING, D. H. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1991, no. 7 [cit. 2009-03-05]. Dostupný z WWW: <http://jcm.asm.org/cgi/reprint/29/7/1281?view=long&pmid=1885726>.

[38] LOUIE, M., LOUIE, L., SIMOR, A. E. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *Canadian Medical Association* [online]. 2000, no. 3 [cit. 2009-03-05]. Dostupný z WWW: <http://www.cmaj.ca/cgi/content/full/163/3/301>.

[39] SAMBROOK, Joseph, RUSSELL, David W. *Molecular cloning:a laboratory manual*. 3. vyd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 2100 s. ISBN 0-87969-577-3.

[40] ABUBAKAR, I. et al. A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. *Health Technology Assessment* [online]. 2007, no. 36 [cit. 2009-03-29]. Dostupný z WWW: <http://www.hta.ac.uk/fullmono/mon1136.pdf>.

[41] NARAVANENI, R., JAMIL, K. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques [online]. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2005, no. 54

[cit. 2009-03-30]. Dostupný z WWW: <http://jmm.sgmjournals.org/cgi/content/full/54/1/51>.

[42] LEE, S. H. et al. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. *Journal of Veterinary Science* [online]. 2009, no. 10 [cit. 2009-02-26]. Dostupný z WWW: < http://www.vetsci.org/2009/pdf/43.pdf>.

[43] FUKUSHIMA, H. et al. Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2007, no. 1 [cit. 2009-03-05]. Dostupný z WWW: <http://aem.asm.org/cgi/content/full/73/1/92?view=long&pmid=17056684>.

[44] XUAN GUO, X. et al. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hilA*. *Applied and environmental mikrobiology* [online]. 2000, no. 12 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW: <http://aem.asm.org/cgi/content/full/66/12/5248?view=long&pmid=11097898>.

[45] BOHAYCHUK, V. M. et al. A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matricest. *J Food Prot.* [online]. 2007, no. 5 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17536664?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVLinkOut>.

[46] SEO, K. H. et al. Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. *J Food Prot*. [online]. 2004, no. 5 [cit. 2009-04-02]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.

[47] O´REGAN, E. et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiology* [online]. 2008, no. 8 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/156>.

[48] WANG, G., CLARK, C. G., RODGERS, F. G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal*

of Clinical Microbiology [online]. 2002, no. 10 [cit. 2009-03-31]. Dostupný z WWW: <http://jcm.asm.org/cgi/content/full/40/10/3613?view=long&pmid=12354854>.

[49] CARO, I. et al. Detection, occurrence, and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from raw ewe´s milk in Spain. *J Food Prot.* [online]. 2006, no. 4 [cit. 2009-04-02]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16629039?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum>.

[50] STAMPI, S. et al. Detection of *Escherichia coli* O157 in bovine meat products in northern Italy. *Int J Food Microbiol.* [online]. 2004, no. 3 [cit. 2009-03-31]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.

[51] FRATAMICO, P. M., BAGI, L. K. PEPE, T. A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine feces. *J Food Prot.* [online]. 2000, no. 8 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10945576?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum>.

[52] WILSON, D. J. et al. Tracing the source of campylobacteriosis. *PLOS Genetics* [online]. 2008, no. 9 [cit. 2009-04-02]. Dostupný z WWW: <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1000203>.

[53] SAILS, A. D. et al. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2003, no. 3 [cit. 2009-04-02]. Dostupný z WWW: < http://aem.asm.org/cgi/content/full/69/3/1383?view=long&pmid=12620820>.

[54] McCREA, B. A., MACKLIN, K. S. Effect of different cleaning regimens on recovery of *Clostridium perfringens* on poultry live haul containers. Poultry Science [online]. 2006, no. 5 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW: <http://ps.fass.org/cgi/reprint/85/5/909>.

[55] KIM, S., LABBE R. G. et al. Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2000, no. 3 [cit. 2009-04-02]. Dostupný z WWW: <http://ps.fass.org/cgi/reprint/85/5/909>.

[56] BUBERT, A. et al. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1999, no. 10 [cit. 2009-04-02]. Dostupný z WWW:

< http://aem.asm.org/cgi/content/full/65/10/4688?view=long&pmid=10508109>.

[57] MAKINO , S. I., OKADA, Y., MARUYAMA, T. A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* from foods by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1995, no. 10 [cit. 2009-04-02]. Dostupný z WWW: < http://aem.asm.org/cgi/reprint/61/10/3745?view=long&pmid=7487010>.

[58] WAAGE, A. S. et al. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 1999, no. 3 [cit. 2009-02-03]. Dostupný z WWW: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119099155/PDFSTART>.

[59] BEJ, A. K. et al. Polymerase chain reaction- gene probe detection of microorganisms by using filter- concentrated samples. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1991, no. 12 [cit. 2009-02-03]. Dostupný z WWW: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184007>.

[60] TSEN, H. Y., LIN, C. K., CHI, W. R. Development and use of 16S r RNA gene tergeted PCR primers for the identification of *Escherichia coli* cells in water. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 1998, no. 3 [cit. 2009-02-03]. Dostupný z WWW: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119136528/PDFSTART>.

[61] DOS SANTOS, Luciana Ruschel et al. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* [online]. 2001, no. 5 [cit. 2009-02-03]. Dostupný z WWW: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652001000500002&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

[62] OLSEN, John Elmerdahl et al. *Salmonella identification by the polymerase chain reaction (United States Patent: 6004 747)* [online]. 1999 [cit. 2009-04-27]. Dostupný z WWW: < http://www.patentstorm.us/patents/6004747/fulltext.html>.

[63] AABO, Soren et al. Evaluation of a Salmonella-specific DNA probe by colony hybridization using non-isotopic and isotopic labeling. *Acta Patologica* ,

Microbiologica, et Immunologica Scandinavica [online]. 1992, no. 7 [cit. 2009-04-29]. Dostupný z WWW: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1642849>.

[64] CANDRIAN, U. et al. Detection of Escherichia coli and identification of enterotoxigenic strains by primer-directed enyzmatic amplification of specific DNA sequences. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1991, no. 4 [cit. 2009-04-29]. Dostupný z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1854602>.

[65] BEJ, A. K. et al. Detection of coliform bakteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1990, no. 2 [cit. 2009-04-28]. Dostupný z WWW: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/56/2/307>.

[66] FRICKER, E. J., FRICKER, C. R. Application of the polymerase chain reaction to the identification of *Escherichia cdi* and coliforms in water. Letters in Applied Microbiology [online]. 1994, no. 19 [cit. 2009-04-29]. Dostupný z WWW: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119837105/PDFSTART>.

[67] EDWARDS, Mary C., GIBBS, Richard A. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Research* [online]. 1994, no. 3 [cit. 2009-04-29]. Dostupný z WWW: <http://genome.cshlp.org/content/3/4/S65.full.pdf>.

[68] RYCHLIK, W., SPENCER, W. J., RHOADS, R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Oxford University Press* [online]. 1990, no. 21 [cit. 2009-04-28]. Dostupný z WWW: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=2243783>.

[69] STOCKTON, J. et al. Multiplex PCR typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1998, no. 10 [cit. 2009-04-28]. Dostupný z WWW: <http://jcm.asm.org/cgi/content/full/36/10/2990>.

[70] FRATAMICO, P. M., STROBAUGH, T. P. Simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 1998, no. 21 [cit. 2009-05-7]. Dostupný z WWW: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=1709295>.

[71] LIN, C. K., TSEN, H. Y. Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. *Journal of Applied*

Bacteriology [online]. 1996 no. 6 [cit. 2009-04-29]. Dostupné z WWW: < http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/120832135/PDFSTART>.

[72] SOUMET, C. et al. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 1994 no. 5 [cit. 2009-04-29]. Dostupné z WWW: < http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119970165/PDFSTART>.

[73] AABO, S., ANDERSEN, J. K., OLSEN, J. E. Research note: Detection of *Salmonella* in minced meat by the polymerase chain reaction method. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 1995 no. 3 [cit. 2009-04-29]. Dostupné z WWW: < http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119834845/PDFSTART>.

[74] MAHON, J. et al. Comparison of multiplex PCR and standard bacteriological methods of detecting *Salmonella* on chicken skin. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 1994 no. 3 [cit. 2009-04-29]. Dostupné z WWW: < http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119837143/PDFSTART>.

[75] BURKHALTER, P. W. et al. Detection of *Salmonella* spp. in eggs: DNA analyses, culture techniques, and serology. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International* [online]. 1995 no. 6 [cit. 2009-04-29]. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8664593>.

[76] COHEN, Huguette, J., MECHANDA, Subbaiah, M., LIN Wei. PCR amplification of the *fimA* gene semence of *Salmonella* Typhimurium, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1996 no. 12 [cit. 2009-04-29]. Dostupné z WWW: < http://aem.asm.org/cgi/reprint/62/12/4303>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

bp	Párů bazí
cDNA	Komplementární DNA
CFU	Kolonie tvořících jednotek
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dATP	Deoxyadenizintrifosfát
dCTP	Deoxycytidintrifosfát
dGTP	Deoxyguanozintrifosfát
dNTP	Deoxynukleozidtrifosfát
dTTP	Deoxytymidintrifosfát
ddNTP	Dideoxynukleozidtrifosfát
dsDNA	Dvouřetězcová molekula DNA
F primer	Forward primer
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NK	Nukleová kyselina
ORF-C	Otevřený čtecí rámec
PCR	Polymerázová řetězová reakce
R primer	Reverse primer
ssDNA	Jednořetězcová molekula DNA
T_A	Annealingová teplota

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. …… 40

Obr. 2. ……..…… 44

Obr. 3. …… 48

Obr. 4. …… 51

Obr. 1. Elektroforetický agarózový gel PCR produktů získaných při detekci *Salmonella* Typhimurium

Obr. 2. Elektroforetický agarózový gel PCR produktů získaných při detekci *E. coli*

Obr. 3. Elektroforetický agarózový gel PCR produktů získaných při paralelní detekci *Salmonella* a *E. coli*

Obr. 4. Elektroforetický agarózový gel amplikonů *Salmonella* a *E. coli* detekovaných ve vzorcích kuřat

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. …… 32

Tab. 2. ……..…… 39

Tab. 3. …… 42

Tab. 4. …… 43

Tab. 5. …… 46

Tab. 6. ……..…… 46

Tab. 7. …… 49

Tab. 8. …… 50

Tab. 1. Tabulka použitých primerů

Tab. 2. Výsledky detekce *Salmonella* při různých annealingových teplotách

Tab. 3. Výsledky detekce *E. coli* 17 při použití různých primerů a různých annealingových teplot

Tab. 4. Výsledky detekce *E. coli* při různých annealingových teplotách

Tab. 5. Výsledky multiplex PCR detekce kmene *S.* Typhimurium 10 v kombinaci s kmeny *E. coli* při různých annealingových teplotách

Tab. 6. Výsledky multiplex PCR detekce kmene *S.* Typhimurium 352 v kombinaci s kmeny *E. coli* při různých annealingových teplotách

Tab. 7. Amplifikační profil pro detekci *Salmonella* a *E. coli*

Tab. 8. Výsledky multiplex PCR detekce vybraných kmenů *Salmonella* a *E. coli* ze vzorků kuřete