

Možnosti detekce bakterií rodu *Clostridium* kultivačními a non-kultivačními technikami

Bc. Ema Haroková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav chemie
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ema HAROKOVÁ**
Osobní číslo: **T08794**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**

Téma práce: **Možnosti detekce bakterií rodu Clostridium kultivačními a non-kultivačními metodami.**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika, výskyt, význam a taxonomie bakterie rodu Clostridium.
2. Detekce anaerobních bakterií a jejich způsob kultivace.
3. Non-kultivační metody detekce bakterií rodu Clostridium.

II. Praktická část

1. Detekce bakterií rodu Clostridium různými kultivačními technikami.
2. Detekce bakterií rodu Clostridium non-kultivačními metodami.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] Görner F. A Valík L., Aplikovaná mikrobiologie požívatin, Malé centrum 2004.
- [2] Jay J. M., Modern Food Microbiology, 6th Edition, Aspen Publishers, Maryland, 2000.
- [3] Aranda E., Rodríguez M. M., Assensio M.A. and Córdoba J.J., Detection of Clostridium botulinum types A, B, E and F in foods by PCR and DNA probe., Lett. Appl. Microbiol 25, 1997, 186-1900.
- [4] Herman L. M. F., De Block J. H. G. E. and Waes G. M. A. V. J., A direct PCR detection method for Clostridium tyrobutyricum spores in up to 100 milliliters of raw milk, Appl. Environ. Microbiol 61, 1995, 4141-4146.
- [5] Klijn N., Nieuwenhof F. F. J., Hoolwerf J. D. et al., Identification of Clostridium tyrobutyricum as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification, Appl. Environ. Microbiol. 61, 1995, 2919-2924.
- [6] Le Bourhis A-G., Saunier K., Doré J. et al., Development and validation of PCR primers to assess the diversity of Clostridium spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis, Appl. Environ. Microbiol. 71, 2005, 29-38.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 13. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Antonín Klásek, DrSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Možnosti detekce mikroorganismů v potravinách či jiných kulturách je celá řada. Od klasických biologických metod léty ověřených až po moderní, molekulárně biologické, které slouží k přímé detekci a průkazu přítomnosti nejen patogenních mikroorganismů ve vyšetřovaných vzorcích.

V této práci byly použity dvě takové biologické metody. Klasické kultivace, pomocí které jsme si ověřili růst a přítomnost 10 vybraných kmenů bakterií rodu *Clostridium* na 5 druzích půd. Díky ní jsme také získali vzorky čistých kultur pro použití pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) s detekcí pomocí agarosové gelové elektroforézy s následnou UV vizualizací.

Klíčová slova: detekce, bakterie rodu *Clostridium*, kultivace, polymerázová řetězová reakce (PCR)

ABSTRACT

There are many possibilities of microbial detection in foods and clinical samples. From classical biological methods to modern molecular biological technology for the determination for the direct detection and document of present not only pathogens microorganisms in the examinant cultures.

In this work are used the such as two biological methods. The traditional cultural techniques for the direct isolation and occurrence of 10 selected strains of *Clostridium* bacteria. So we obtained samples „clear cultures“ for using in the others method, the polymerase chain reaction (PCR) with detection of agarose gel electrophoresis with UV visualization.

Keywords: detection, cultivation, the polymerization chain reaction (PCR), cultivation

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za odborné vedení, spolupráci, trpělivost a udělování cenných rad.

Také bych chtěla poděkovat laborantkám Lence Plechačové, Olze Haukové a Bc. Haně Miklíkové za ochotu a pomoc v laboratoři při měření praktické části diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala svým rodičům, bratrovi, přátelům, spolužákům a všem učitelům za podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

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).

Dále prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAGU jsou totožné.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

Motto:

„Láska v minulosti je jen vzpomínka, láska v budoucnosti je jen očekávání, skutečná láska prostě žije v přítomnosti“.

(Budha Šákjamuni)

OBSAH

ÚVOD.....	12
I TEORETICKÁ ČÁST	13
I BAKTERIE RODU <i>CLOSTRIDIUM</i>	14
1.1 VÝZNAM BAKTERIÍ RODU <i>CLOSTRIDIUM</i>	16
1.2 TAXONOMIE	18
1.3 MORFOLOGIE, VÝSKYT A VÝZNAM VYBRANÝCH BAKTERIÍ RODU <i>CLOSTRIDIUM</i>	18
1.3.1 <i>Clostridium histolyticum</i>	19
1.3.2 <i>Clostridium novyi</i>	19
1.3.3 <i>Clostridium perfringens</i> (<i>Clostridium welchii</i>).....	20
1.3.4 <i>Clostridium septicum</i>	22
1.3.5 <i>Clostridium sporogenes</i>	23
1.3.6 <i>Clostridium butyricum</i>	23
1.3.7 <i>Clostridium difficile</i>	23
1.3.8 <i>Clostridium ramosum</i>	25
1.3.9 <i>Clostridium intestinale</i>	26
2 DETEKCE ANAEROBNÍCH BAKTERIÍ A JEJICH ZPŮSOB KULTIVACE.....	27
2.1 METODY IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ	27
2.1.1 Přímé metody:	32
2.1.2 Nepřímé metody	32
2.2 KULTIVACE	33
2.2.1 Dělení pŮd	35
2.2.2 Složky kultivačních pŮd	36
2.2.3 Podmínky kultivace.....	39
2.2.3.1 Teplota	39
2.2.3.2 Světlo	40
2.2.3.3 pH média během kultivace.....	41
2.2.3.4 Oxidačně-redukční potenciál (E_h).....	41
2.2.3.5 Délka kultivace	42
2.2.4 Anaerobní kultivace	42
2.2.5 Používaný postup pro anaerobní kultivaci	44
2.3 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ.....	44
2.3.1 Identifikace pomocí biochemických testů	45
2.3.2 Nejčastěji užívané biochemické testy.....	46
II PRAKTICKÁ ČÁST	48
3 MOŽNOSTI DETEKCE BAKTERIÍ RODU <i>CLOSTRIDIUM</i> RŮZNÝMI KULTIVAČNÍMI A NON-KULTIVAČNÍMI TECHNIKAMI	49
3.1 KULTIVAČNÍ METODA.....	49
3.2 NON-KULTIVAČNÍ METODY.....	50
3.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	50

3.3	APLIKACE PCR DIAGNOSTIKY U ANAEROBNÍCH BAKTERIÍ.....	52
3.3.1	Broad-range PCR	53
3.3.2	RT PCR (zpětná, reverzní PCR)	53
3.3.3	Q-PCR (real-time PCR, kvantitativní PCR).....	53
3.3.4	Long PCR.....	54
3.3.5	RACE PCR (rapid amplification of cDNA).....	55
3.3.6	Multiplex PCR	55
3.3.7	Nested PCR	56
3.4	METODY ZALOŽENÉ NA ANALÝZE FINGERPRINTŮ	56
3.4.1	Fingerprintová analýza rDNA	56
3.4.2	Genomická PCR-based fingerprinting	58
3.5	VÝHODY A NEVÝHODY PCR	58
3.6	ANALÝZA VELIKOSTI FRAGMENTŮ.....	60
3.6.1	Radioaktivní a neradioaktivní (neizotopové) značení.....	61
3.6.2	Agarosová gelová elektroforéza	62
3.6.3	Polyakrylamidová gelová elektroforéza	63
3.6.4	Analýza jednovláknového konfirmačního polymorfismu (SSCP).....	63
3.6.5	Kapilární elektroforéza.....	64
4	CÍL PRÁCE	66
5	MATERIÁL A METODY	67
5.1	CHEMIKÁLIE.....	67
5.2	KOMPONENTY PRO PCR.....	67
5.3	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	67
5.4	KULTURY BAKTERIÍ.....	68
5.5	KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY	69
5.5.1	Kultivační média	69
5.5.1.1	Roztoky pro izolaci DNA a gelovou elektroforézu	71
5.6	METODY.....	72
5.6.1	Kultivace bakteriálních buněk.....	72
5.6.2	Izolace DNA metodou lyze v lyzačním pufu	72
5.6.3	Polymerázová řetězová reakce	73
5.6.3.1	Vlastní provedení PCR reakce	75
	Optimalizace PCR amplifikace.....	75
5.6.4	Agarosová gelová elektroforéza.....	76
	Příprava agarosového gelu	76
	Nanášení vzorku na gel.....	76
	Průběh elektroforézy a vizualizace DNA fragmentů	76
	Stanovení velikosti specifického fragmentů DNA	77
6	VÝSLEDKY A DISKUSE	78
6.1	KULTIVACE BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK	78
6.2	PCR	90
6.2.1	Optimalizace PCR reakce.....	90
6.2.2	Citlivost reakce s postupně ředěnou DNA matricí.....	93

ZÁVĚR	97
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	98
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	106
SEZNAM OBRÁZKŮ	108
SEZNAM TABULEK.....	109
SEZNAM PŘÍLOH.....	110

ÚVOD

Jen malá část všech bakterií, které se vyskytují okolo nás v živé přírodě, mají schopnost vyvolat různé druhy onemocnění a jsou tedy pro člověka patogenní. Mezi takové mikroorganismy patří i bakterie rodu *Clostridium*. Ne všechny kmeny jsou schopny vyvolávat různé druhy endogenních a exogenních onemocnění prostřednictvím svým toxinů.

Taxonomicky se jedná o velmi důležitý rod náležící převážně mezi grampozitivní anaeroby volně se vyskytující v půdě, ve vodě, ve splaškách, v mořských sedimentech a mimo jiné také jako běžná součást lidské střevní mikroflóry, kde však žijí symbioticky. Teprve prostřednictvím potravin, které mohou být kontaminovány sekundárně, dochází ke vzniku patogenity a následné šíření infekce.

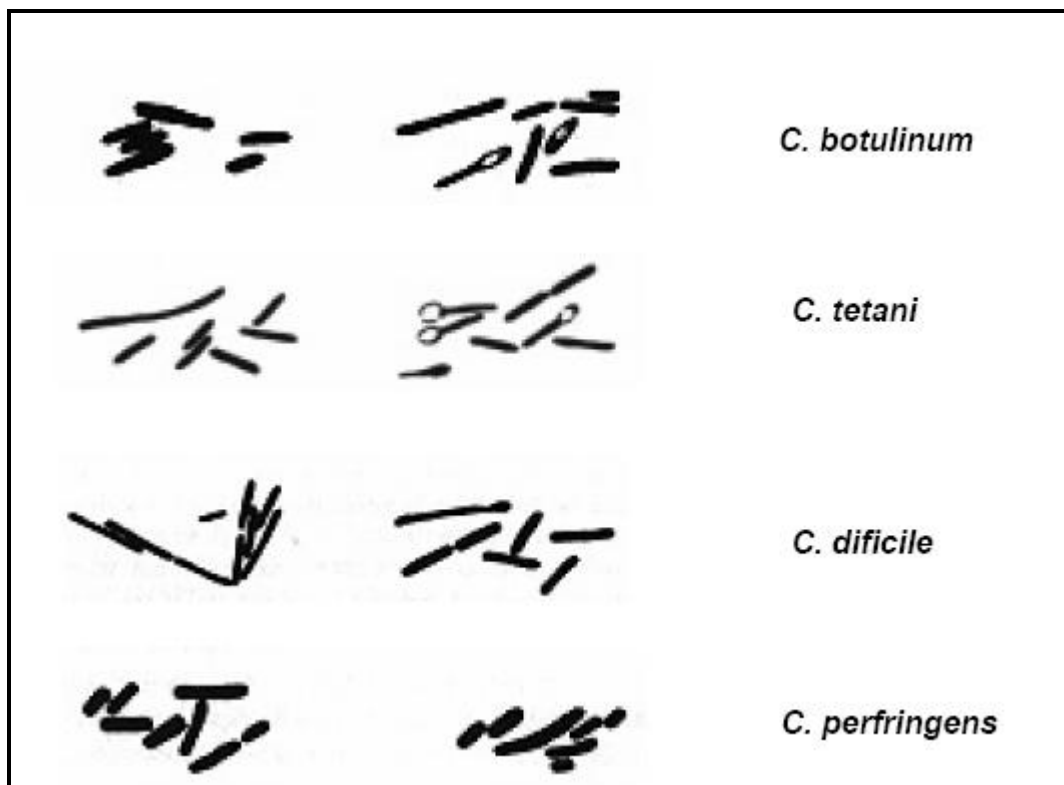
V dnešní moderní době je vynakládáno spousta finančních prostředků a úsilí na potlačení jakéhokoliv šíření jejich kontaminace. Nástrojem pro vyšetření jejich přítomnosti v potravinách a v jiných klinických vzorcích se stala i jedna a od 80. let minulého století velmi rychle se rozvíjející molekulárně-biologická metoda, polymerázová řetězová reakce (PCR, polymerase chain reaction). Ve srovnání s klasickými mikrobiologickými metodami (zejména kultivačními) se jedná o velmi rychlou, senzitivní a časově méně náročnou techniku s přesnými výsledky.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE RODU *CLOSTRIDIUM*

Rod *Clostridium* je velmi rozsáhlý a z potravinářského hlediska velmi důležitý rod, zahrnující více než 150 druhů tvořící endosporulující peritrichní tyčinky, které jsou ve většině případů grampozitivní. Spora bývá převážně širší než vegetativní buňka [20], [[42]. Rod *Clostridium* je obligátně anaerobní [20], [44]. Pro klostridia je typický anoxibiotický metabolismus, kdy kyslík inhibuje růst a po 5 a 10 minutách působení usmrcuje vegetativní buňky většiny druhů. Intenzita této citlivosti je druhově odlišná. Některé druhy jsou ke kyslíku méně citlivé, a jsou schopny i případného pomalého rozmnožování i za omezeného přístupu vzduchu, ale většinou se za přítomnosti kyslíku nerozmnožují a hynou [20].

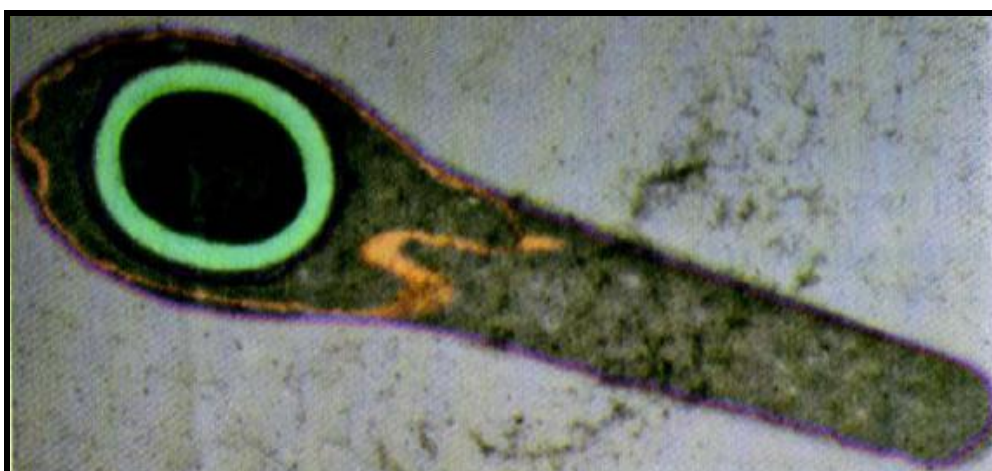
Růst bakterií a jejich metabolismus je závislý na adekvátním příjmu živin pocházejících z okolního prostředí. Jednotlivé komponenty jsou tráveny specifickými extracelulárními enzymy, které jsou brány do buňky specifickým transportním systémem a mobilizovány specifickými enzymy, syntézou a aktivitou prostřednictvím živin vyskytujících se v okolním prostředí [23].



Obrázek 1: Příklady klostridií a jejich spor [57]

Některé druhy mají silné proteolytické schopnosti a uplatňují se při anaerobním rozkladu bílkovin (např. *Clostridium sporogenes*), jiné mají silné sacharolytické schopnosti

a vedle jednotlivých cukrů využívají i oligosacharidy a škrob, popř. celulosu. Některé druhy mají obojí, jak proteolytické, tak i sacharolytické schopnosti, jiné fixují vzdušný dusík [6], [20], [49]. Sacharolytické klostridie využívají pro svůj růst širokého spektra zdrojů uhlíku. Jedná se například o polymerní škrob a celulosu, které jsou štěpeny velkým množstvím enzymů a jejich produktů. Rovněž mohou využívat i jiné rozpustné nízkomolekulární látky, které jsou akumulovány spoustou rozličných mechanismů, z nichž dominující postavení má fosfoenol-dependední fosfotransférázový systém (PTS). Přesný mechanismus není dosud zcela známý, vše bude záležet na detailním pochopení molekulárního rozboru genů a jejich projevů, ale je nezbytný pro celkové pochopení fyziologie u klostridií [23], [62].



Obrázek 2: Bakteriální endospora [71]

Klostridie používají při svých oxidoredukčních procesech enzym s Fe^{2+} v molekule, který začíná fungovat až při záporném oxidoredukčním potenciálu v prostředí (mezi -100 až 200 mV). Proto se začínají množit až tehdy, když prostředí této hodnoty dosáhne. Energií pro své životní procesy získávají z anaerobní glykolýzy. Nefermentující klostridie získávají energii oxidoredukci mezi dvěma aminokyselinami. Podle toho z jakých substrátů získávají klostridie energii lze rozdělit do několika skupin [6], [20], [49].

1. klostridie fermentující sacharidy,
2. klostridie štěpící aminokyseliny z bílkovin a peptonů,
3. klostridie schopné využít jak sacharidy tak bílkoviny,
4. klostridie, pro něž jsou hlavním substrátem puriny a pyrimidiny [6].

Při anaerobní oxidaci sacharidů tvoří příslušníci rodu *Clostridium* velké množství plynu (CO_2 a H_2), což se nepříznivě projevuje např. v sýrařství při tzv. duření sýrů [1].

Z rodu *Clostridium* byly vyňaty druhy, které využívají kyslík, sírany a siřičitany pro anaerobní oxidaci organických sloučenin, a tím produkují značné množství sirovodíků. Z těchto druhů byl vytvořen nový rod – *Desulfotomaculum*. Od rodu *Clostridium* se liší také tím, že je gramnegativní a tvoří spory jen o málo širší než je vegetativní buňky [1].

Klostridie jsou mikroorganismy schopné fixace vzdušného dusíku v anaerobních podmínkách (striktně anaerobní bakterie). Mezi druhy vyznačující se touto schopností patří především *C. pasteurianum*, *C. aceticum*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. perfringens*, *C. felsineum*. Energií potřebnou pro fixaci N₂ získávají zkvašováním cukrů na kyselinu máselnou a octovou. Jsou rozšířeny půdě, rašeliništích a bahnech, a to díky toleranci k pH prostředí. Fixace těmito organismy jsou významné především v lesních a kyselých půdách [32].

1.1 Význam bakterií rodu *Clostridium*

Většina klostridií je schopna tvořit toxiny, které způsobují onemocnění lidí i zvířat [1]. Vyvolávají 3 druhy onemocnění: neurointoxikace (neurotoxiny), nekrotizující infekce měkkých tkání a nitrobřišních orgánů a chorobné procesy odehrávající se ve střevě. Neurotoxiny jsou proteinové povahy [10]. Ke skupině neurotoxinů patří botulotoxin produkovaný *C. botulinum* a způsobující onemocnění zvané botulismus a tetanospasmim produkovaný *C. tetani*, které způsobuje onemocnění zvané tetanus. Tyto dva toxiny patří mezi nejnebezpečnější bakteriální toxiny. I velmi malé dávka botulotoxinu v množství 1 mg představuje smrtící dávku pro 16 000 lidí. *C. botulinum* se v těle živočicha nerozmnožuje, takže působí pouze toxinem vytvořeným při rozmnožování této bakterie v potravíně [1]. Výskyt tetanu je dnes již omezen díky očkování a botulismus není tak častý značně díky vysokým mikrobiálním kontrolám potravin. Ve světě je tetanus nejvíce rozšířen v rozvojových zemích Afriky. Podle WHO se dnes tetanus vyskytuje v 52 zemích světa, v ostatních vymizel díky řádnému očkování [1].

Ke skupině histotoxinů patří toxiny produkované *C. perfringens*, *C. novyi* typ A, *C. septicum* a *C. difficile*. Tyto druhy způsobují klostridiové myonekrózy, alimentární intoxikace, průjmy a pseudomembránové enterokolitidy [6]. Otrava histotoxinem vyprodukovaným z *C. perfringens* nastává pouze při silné kontaminaci potraviny, tj. při koncentraci

buněk alespoň 10^6 g^{-1} . Toxin se tvoří při sporulaci, která probíhá až v trávicím traktu člověka [1].

I přes svou vysokou toxicitu je možno klostridie použít v lékařství při léčbě dětské obrny (diparetické formy) anebo k průmyslové výrobě bioetanolu, kdy se využívají termofilní kmeny klostridií pro kvašení celulózy na etanol při teplotě okolo $60 \text{ }^\circ\text{C}$ až $70 \text{ }^\circ\text{C}$ [27]. Tuto schopnost mají sacharolytické druhy *C. acetobutylicum* a *C. butyricum*, které se používají pro kvasnou výrobu kyseliny máselné a první z nich také pro výrobu butanolu a acetonu kvasnou cestou [1]. Dnes se také uvažuje o možnosti použití klostridiálního bakteriofágu jako součást konzervantu pro silážování [19].

Botulotoxin také příznivě ovlivňuje růst ošetřených svalů a může pomoci předcházet rozvoji svalových kontraktur a trvalých kostních deformací. Dále se botulotoxin využívá v kosmetice na vyhlazení vrásek a snížení sekrece potu [6], [17]. Dále může být zneužit také jako biologická zbraň [21].

Výskyt těchto sporulujících bakterií je příčinou hned několika druhů vad v sýrech s delší dobou zrání (například Beaufort, Emmental nebo Comté) jako následek tzv. pozdního duření sýrů nebo máselného kvašení. Podstatou tohoto jevu je biochemický děj, kdy dochází k přeměně kyseliny mléčné na kyselinu máselnou (tzv. žluknutí) a vzniku dalších vedlejších produktů jako je kyselina octová, oxid uhličitý a vodík, který nese odpovědnost za velikost ok v sýrech a v horším případě může způsobit jeho popraskání. Tyto klostridie pocházejí ze syrového mléka, které může být kontaminováno během dojení, z fekálií pokud není dostatečně dodržována hygiena v boxech. Také silážové krmivo pokud je nižší kvality, je jedním z nejdůležitějších zdrojů spor klostridií [28].

Z nejčastějších klostridií, jejichž přítomnost byla zjištěna ve zduřelých sýrech, a která mají schopnost fermentovat kyselinu mléčnou na kyselinu máselnou a případné další deriváty, lze zmínit například *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*. Z ostatních, které kdy byly zaznamenány, je to například *C. perfringens*, *C. beijerincki*, či *C. tetanomorphum*, jejichž přítomnost byla také prokázána v mléce [15], [28], [66]. Podle závěrů studie z roku 1995 bylo vyvozeno, že pouze *C. butyricum* může vyvolat fermentaci kyseliny mléčné [33]. Testování vzorků mléka se provádí kultivací po 10 minut při $85 \text{ }^\circ\text{C}$. Výsledný test na přítomnost těchto bakterií v 0,1 ml mléka musí vyjít negativní [15], [28].

1.2 Taxonomie

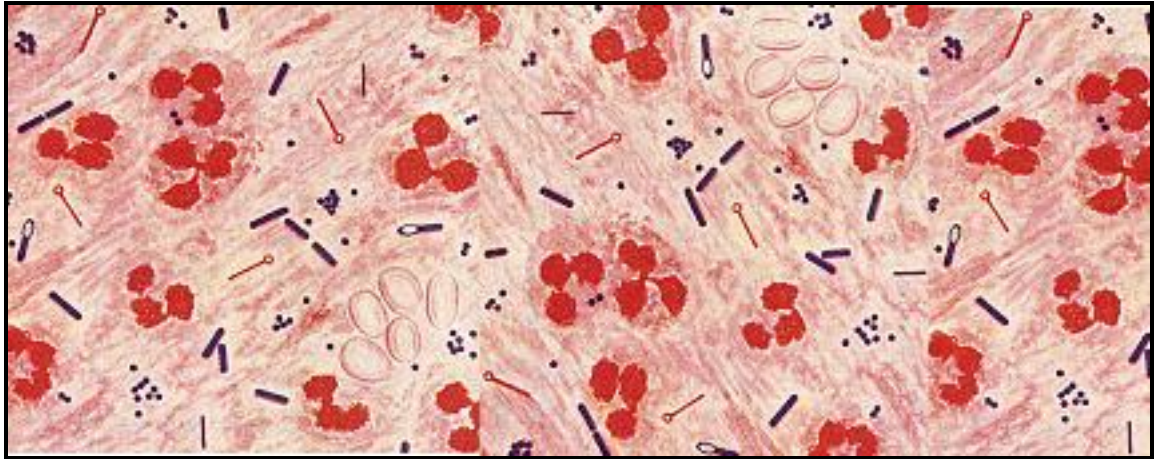
Rod *Clostridium* je řazen do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Clostridia*, řádu *Clostridiales* a čeledi *Clostridiaceae*. Třída obsahuje tři řády a řadu čeledí, i když většina zástupců je řazena taxonomicky v řádu *Clostridiales* [21]. Zahrnuje přes 60 druhů grampozitivních anaerobních sporulujících tyčinek s nízkým procentuálním obsahem G + C v DNA. Od bacilů se odlišují absencí aerobní respirace. Někteří zástupci se barví negativně. Většinou se jedná o saprofyty. Jen několik málo druhů je schopno vyvolat infekční onemocnění u lidí a zvířat prostřednictvím svých exotoxinů proteinové povahy [20], [21].

1.3 Morfologie, výskyt a význam vybraných bakterií rodu *Clostridium*

Bakterie rodu *Clostridium* tvoří buňky tvaru pleomorfních tyčinek, které jsou rovné nebo mírně zakřivené o různé délce a průměru. Mohou být uspořádané po dvou, v krátkých řetízích, se zakulacenými nebo občas zašpičatělými konci, ojediněle také ve spirálách. Některé druhy mohou vytvářet dlouhá vlákna. Jejich uspořádání je charakteristické pro jednotlivé druhy. Také jsou díky peritrichálně uloženým bičíkům pohyblivé [21], [25]. V rané fázi růstu se barví grampozitivně [21].

Jejich charakteristikou vlastností je tvorba oválných či kulatých endospor, které jsou velmi odolné, termorezistentní [20], [21]. Spora je klidovým stadiem bakterie, obvykle s velmi silnou stěnou a odolné vůči všem fyzikálním i chemickým vlivům [20]. Energetický metabolismus spory je převážně anaerobní, avšak při klíčení nastupuje u fakultativně anaerobních druhů opět aerobní metabolismus, který poskytuje mnohem více energie [1]. Podle umístění spory v buňce se rozlišují bakterie se sporami centrálními, subterminálními a terminálními. Spora je většinou širší než mateřská buňka (Obrázek 2) [18].

Klostridie se běžně vyskytují v půdě, bahně, mořských sedimentech, rozkládajícím se rostlinném materiálu, v živočišných a rostlinných produktech, ve střevech člověka a zvířat, v jícnu obratlovců, u hmyzu, a v humánním či veterinárním klinickém materiálu (Obrázek 3). Sekundárně se vyskytují v siláži, mléce, sýrech nebo v konzervách [20].



Obrázek 3: Barvený vzorek hnisu alespoň s třemi druhy klostridií [54]

1.3.1 *Clostridium histolyticum*

Clostridium histolyticum je štíhlý, aerotolerantní pohyblivý mikrob, silně proteolytický, který však neštěpí sacharidy. Jeho spory mohutně vyklenují buňku. Zdrojem myonekrózy způsobené touto bakterií, je hlavní toxin α s letálním a nekrotizujícím účinkem a také celá řada proteas, např. toxin β (kolagenasa) [22].

1.3.2 *Clostridium novyi*

Tento grampozitivní mikrob se podobá *C. perfringens*, jeho buňky jsou však větší, více pleomorfní. Je striktně anaerobní, na vzduchu rychle hyne. Má peritrichiální bičíky, za přístupu kyslíku se však nepohybuje. Patří mezi největší klostridie, buňky typu A a D měří $0,6 \times 1,4 \times 1,6 - 1,7 \mu\text{m}$, buňky B $1,1 \times 2,5 \times$ až $2,2 \mu\text{m}$ [20], [49], [65]. Oválné spory jsou centrální nebo subterminální. Je rozšířen v půdě a způsobuje onemocnění u lidí i zvířat. *C. novyi* má čtyři typy: A, B, C, D, které se rozlišují podle produkovaných toxinů a antigenů. V patologii má význam jen typ A, neboť způsobuje plynovou gangrénu (snět). Myonekróza vyvolaná *C. novyi* je spojena s toxemií. Jednotlivé filtráty kultur jsou vysoce toxické a obsahují nejméně čtyři aktivní složky (toxin α , β , δ , ϵ). Mají účinek letální, hemolytický, nekrotický, a aktivitu fosfolipázovou a lipázovou [20], [65].

1.3.3 *Clostridium perfringens* (*Clostridium welchii*)

Clostridium perfringens jsou mezofilní grampozitivní nepohyblivé tyčinky většinou silné (přes 1 μm), krátké 2-4 μm nebo dlouhé (přes 10 μm) [6, [20],[48]. Bývají obaleny polysacharidovým pouzdrém. Jedná se o fakultativně obligátní druh bakterií běžně se vyskytující v gastrointestinálním traktu lidí i zvířat [22]. Je pravidelnou součástí střevní mikroflóry člověka a mnoha domácích a divoce žijících zvířat. Je považován za příležitostného patogena, který může vyvolat toxikózy trávicího traktu [18], [20], [22], [31]. Ve střevě také probíhá vydouvání oválných, subterminálních spor. Spory jsou termorezistentní [22].



Obrázek 4: *Clostridium perfringens* [55]

Roste rychle na selektivních půdách a lze jej identifikovat podle Năglerovy reakce, jejíž podstata spočívá v enzymatické aktivitě fosfolipasy (lecithinasy) na vaječný žloutek. Kolem kolonie se vytvoří zóna precipitace a tento jev je inhibován antisérem proti α -toxinu [29]. Právě tento toxin je hlavním toxinem *C. perfringens* všech typů a je známý jako lecithinasa (fosfolipasa) [22].

V současnosti je známo 6 typů lecithinasy označovaných A-F. Typ A způsobuje nebezpečné gastrointestinální infekce, neboť jím produkováný toxin má povahu enterotoxinu [18], [20], [21], [22], [58]. Gangréna (klostridiová myonekróza) je charakteristická rychlou destrukcí měkké tkáně (Obrázek 5), zejména svalové a produkcí plynu do okolní tkáně [35], [58], [69]. Toto onemocnění patří mezi nejtěžší onemocnění vůbec [35]. V normální zdravé tkáni toto onemocnění nemůže vzniknout, zřejmě proto, že je v ní vysoký oxidoredukční potenciál a klostridie nemohou odolat destrukci a vyhnout se tak fagocytóze [20]. Je příčinou také mnoha jiných klinických onemocnění včetně otrav jídlem [8]. Nicméně toxi-

ny *C. perfringens* řadíme mezi potenciální biologické a toxické vojenské možnosti uplatnění či zneužití ve válečných konfliktech [35].

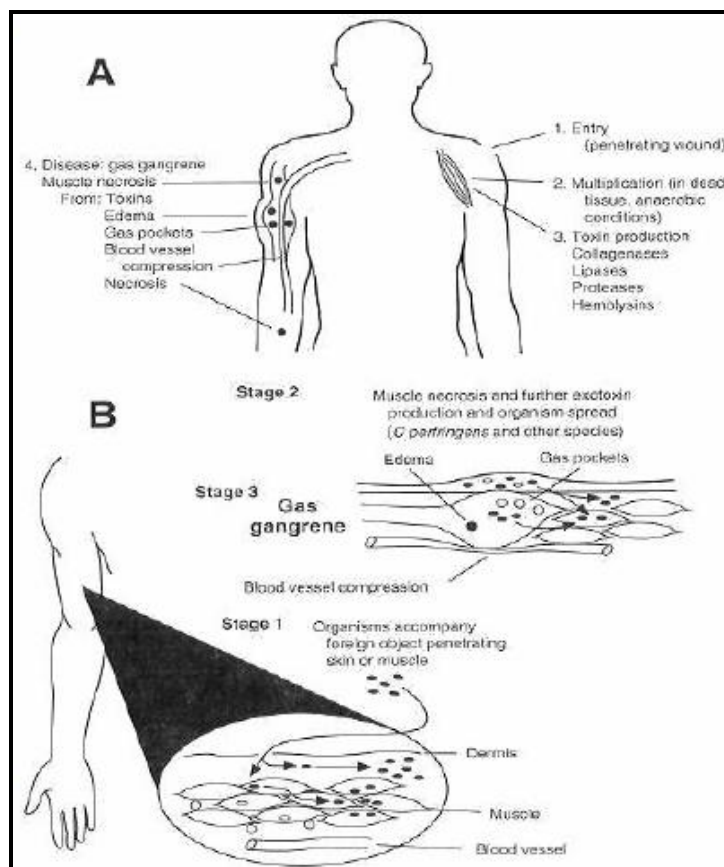


Obrázek 5: Plynatá sněť [57]

Spory se mohou vyskytovat i na kůži, zejména při znečištění střevní mikroflórou [20]. S výkaly se dostávají do půdy, kde jeho spory přežívají velmi dlouho. Poměrně snadno mohou kontaminovat potraviny, zvláště maso [22]. Tento patogen se často vyskytuje i na sliznici vaginy [6].

Zajímavostí je, že produkovaný toxin (enterotoxin) *C. perfringens* typu A, B a D je schopen přežít var a následně po požití ve střevě dochází ke sporulaci a uvolňování toxinů. Otrava však nastává pouze při silné kontaminaci potraviny touto bakterií, tj. při koncentraci buněk v potravine alespoň 10^6 g^{-1} [3]. Po konzumaci infikované potraviny prochází klostridium žaludkem, jehož kyselé prostředí pravděpodobně vyvolá sporulaci, s níž je spojena tvorba enterotoxinu v tenkém střevě (Obrázek 6) [3].

Inkubační doba je obvykle 8-24 hodin. Klinické příznaky zahrnují nevolnost, abdominální kolikové bolesti a průjem. Horečka a zvracení obvykle chybí. Délka trvání onemocnění je krátká 12-24 hodin. U starších a oslabených jedinců může dojít ke komplikacím v důsledku dehydratace organismu [29], [61].



Obrázek 6: *Clostridium perfringens* a jeho možné vstupy infekce [57]

1.3.4 *Clostridium septicum*

Clostridium septicum je pohyblivý, kultivačně nenáročný mikrob rostoucí na běžných půdách ve formě šedých kolonií s nepravidelnými okraji, někdy s plazivým růstem a β -hemolýzou. Teplotní růstové optimum se u tohoto mikroba pohybuje v rozmezí 37-40°C. Přítomnost malého množství kyslíku v atmosféře nepůsobí na vegetativní formy bakterií letálně. I toto klostridium se vyskytuje u lidí i u zvířat, v jejich gastrointestinálním traktu, a také v půdě [22].

Velikost vegetativních buněk je poměrně variabilní (průměr 0,6-1,9 μm a délka 2-30 μm) [22]. Je to grampozitivní tyčka, která často tvoří krátké řetízky [20]. Jeho oválné a subterminální spory rozšiřují buňku [22].

Mikrob je pohyblivý peritrichiálními bičíky, čímž se odlišuje od *C. perfringens*. Tento identifikační znak je důležitý při určení původce vzniku a šíření plynaté sněti do okolních tkání a následujícího způsobu potlačení této nemoci [20], [67]. Je jedním

z nejméně náročných klostridií, roste dobře při 37 °C v běžných půdách. Je sacharolytický a glukóza podporuje růst [20].

C. septicum patří mezi tři nejčastější původce anaerobní myonekrózy, na jejímž rozvoji se podílí především letální nekrotizující hemolytický toxin α , případně některé další toxiny. Infekce se vyznačuje výrazným edémem postižených tkání, často s hemoragiemi. Plyn je v lézi přítomen v menší množství a bakterie je schopna vyvolat sepsi [22], [67]. Je nejčastěji izolován s netraumatické plynaté gangrény u oslabených pacientů [38], [70].

1.3.5 *Clostridium sporogenes*

Tato grampozitivní bakterie je v přírodě široce rozšířena, jak v půdě tak i ve střevě zvířat. Většinou se vyskytuje jako neškodný saprofyt. Ve starých kulturách je gramnegativní. Má oválné centrální i subterminální spory. Je vysoce termorezistentní. Přetrvává i po povaření, které se provádí po selekci termorezistentních patogenů. Jeho spory přežívají povaření po dobu 15 minut až 6 hodin [20].

C. sporogenes se často izoluje z ran spolu s dalšími patogeny. Jeho přítomnost může urychlit vývoj patologických změn, samo *C. sporogenes* však plynovou gangrénu nevyvolává a nemůže být za patogena považováno [20]. Podobně jako tento mikrob se chovají další klostridie například *C. fallax* či *C. bifermentas* [22].

1.3.6 *Clostridium butyricum*

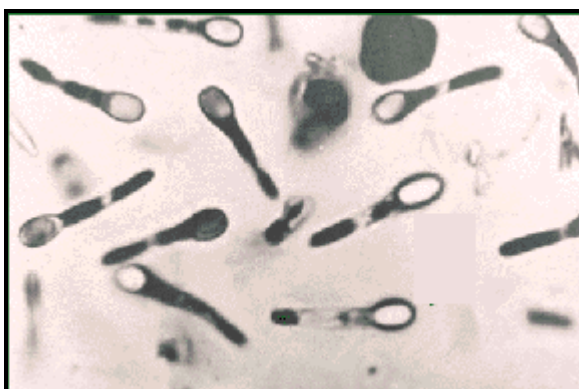
Clostridium butyricum je jedním z mála klostridiálních druhů, kromě *C. botulinum*, produkující neurotoxin typu E, který také způsobuje botulismus, a který se podařilo vyizolovat. Poprvé byl tento neurotoxin získán z nasolených a fermentovaných těstovin a ze sóje v roce 1986 v Římě, jako jeden z prvních případů vyskytujícího se botulismu v Itálii [16], [69] Z dalších klostridií, které produkují tento toxin je například velmi známý a světově rozšířený *C. botulinum*, *C. baratii*. Toxin typu A je nebezpečnější než typ B nebo E, i vyléčení tohoto onemocnění trvá déle [36].

1.3.7 *Clostridium difficile*

C. difficile je poměrně variabilní. Vegetativní buňky mohou být rovné, štíhlé tyčinky s cylindrickými, málo vydouvajícími sporami (asi $0,6 \times 4-6 \mu\text{m}$) nebo velké o rozmě-

rech přibližně $1,2-1,6 \times 6-16 \mu\text{m}$, které tvoří subtermální, lehce vydouvající spory (Obrázek 7). Spory jsou málo termorezistentní [6], [22].

C. difficile je obligátní anaerob, jehož vegetativní stadium ve formě spor přežívá několik měsíců na neživých a suchých površích. Způsobuje onemocnění označované jako postantibiotická (pseudomembránová) kolitida [9,] [41], [46], [60]. Také je považován za patogena způsobující průjemy u novorozenců [47]. Jako možnost prevence a přispění k zvýšení účinků léčby tohoto onemocnění by se mohlo osvědčit pravidelné pobírání kvalitních probiotik [70].



Obrázek 7: *Clostridium difficile* [53]

Ke vzniku klasické pseudomembránózní enterokolitidy dochází součinností dvou toxinů [7], [22], [70]. Toxin A (TcdA) poškodí buňky střevního epitelu a sníží tak účinnost imunitního systému, toxin B (TcdB) tyto porušené buňky zcela destrukuje a na sliznici vznikají nekrózy a ulcerace pokryté pablánami (Obrázek 8) [7], [22]. Je charakteristické žlutým povlakem na mukózní sliznici tračníku [9]. Osoby s protilátkami proti toxinu A jsou chráněny před rozvojem těchto klinických příznaků [22]. Může vyústit v toxický megakolon, neprůchodnost střev, případně v rupturu střeva ohrožující život pacienta [22], [41]. Jeho výskyt byl dosud převážně sporadický, s endogenním patogenetickým mechanismem [5]. K onemocnění touto bakterií dochází převážně u pacientů s predispozicí pro její osídlení a přemnožení při požívání antibiotik, neboť dochází k narušení obvyklé střevní mikroflóry [7], [22], [70]. Proto není překvapující, že *C. difficile* si po čase k antibiotikům vytváří přirozenou resistenci [9].



Obrázek 8: *Pseudomembranózní enterokolitida esovitého tračnicků* [52]

Právě pro lepší pochopení patogenese *C. difficile* je důležité znát problematiku klíčení spor, neboť právě spory jsou producenty různých forem toxinů způsobující toto onemocnění [9]. Toxin A (TcdA) patří mezi enterotoxin, který vyvolává vodnaté, někdy mírně hemoragické průjmy. Naproti tomu toxin B (TcdB) je nekrotizujícím cytotoxinem. Jejich společnou vlastností je schopnost aglutinace erytrocytů králíků, ale nikoliv jiných druhů. U lidí často vyvolávají lehčí průjmová onemocnění, ale také právě již zmiňovanou pseudomembranózní enterokolitidu [6], [46]. Nepovažuje se však za součást běžné mikroflóry [20].

1.3.8 *Clostridium ramosum*

C. ramosum je přísně anaerobní, grampozitivní sporulující bakterie, vyskytující se v obvyklé střevní mikroflóře, ale může být izolován z klinického materiálu jako příležitostný patogen [38], [39]. Často bývá izolován z dětské stolice, gastrointestinálních abscesů anebo ušních infekcí. Zřídka však bývá spojován v přímé souvislosti s bakteriemií, neboť se obvykleji barví gramnegativně než grampozitivně (Obrázek 9) a svými typickými termálními spory je pak těžko detekován [37]. Narozdíl od mnoha jiných bakteriálních druhů, které jsou často příčinou mnoha infekcí, nebývá spojován s rolí hlavního patogena, a tedy příčinou vzniku infekce. Objevuje se hlavně u imunokomprimovaných hostitelů [38]. Může být i příčinou kostní infekce, spondylomyelitidy [37], [38].



Obrázek 9: *Clostridium ramosum* – Gramovo barvení zobrazující variabilitu rodu [38]

C. ramosum je schopen produkovat imunoglobulin IgA1 a IgA2, které mohou ulehčit průnik mukózní sliznicí [38]. Sliznice je běžnou vstupní branou pro to, aby bakterie mohly proniknout epitelem, dosáhnout cévní podkožní tkáně. To může zvýšit jeho intravaskulární invazi a podnítit vznik sekundárních infekcí [38].

Patří mezi skupinu bakterií označovanou „*RIC*“. Kromě *C. ramosum* zde zařazujeme *C. innocuum*, *C. clostridioforme*. Diagnostika a detekce klostridií z této skupiny představují každodenní problém v klinické praxi, neboť snadno tyto klostridie se mohou zaměnit s jiným rodem. Většinou z 70 % izolovaných kmenů při onemocnění spondylomyelitidou byl původce *C. ramosum* [38].

1.3.9 *Clostridium intestinale*

Clostridium intestinale je grampozitivní, aerotolerantní, sporulující, pohyblivý druh, jehož rovné nebo lehce zakřivené tyčinky se mohou vyskytovat jednotně, v párech, či příležitostně v krátkých řetězcích. Rozměrově asi 0,3 μm - 0,4 μm široký a 1,4 μm – 5,4 μm dlouhý. Patří mezi aerotolerantní klostridie. Od ostatních klostridiálních aerotolerantních druhů se liší tím, že je schopen fermentace sacharidů [43].

Jeho spory jsou velké, lehce oválné a termiální a dosahující velikosti od 9,0 μm – 1,1 μm do 2,0 μm , vznikající pouze za anaerobních podmínek [43].

2 DETEKCE ANAEROBNÍCH BAKTERIÍ A JEJICH ZPŮSOB KULTIVACE

Klasifikace bakterií je uspořádání objektů-mikroorganismů do skupin. Nomenklatura je soubor jmen přidělených na základě konsenzu jednotlivým objektům tak, aby měly jednoznačně jméno [20]. Je to proces dokazování, že nový izolát patří k jednomu již ustanovenému a pojmenovanému taxonu [21]. Právě vzájemná návaznost diagnostiky na bakteriální taxonomii je nejvýznamnější v oblasti identifikace.

Přesná identifikace bakterií rodu *Clostridium* je časově náročná a interpretace testů mnohdy obtížná, a proto se nejlépe provádí v referenčních laboratořích [20].

2.1 Metody identifikace mikroorganismů

Identifikace mikroorganismů v denní laboratorní praxi vyžaduje pragmatický přístup k taxonomii.

Bakterie se rozlišují hlavně podle morfologie a barvení, které slouží jako předběžná kritéria pro zařazení neznámého kmene do příslušné skupiny. Gramovým barvením, jenž je výrazem základního rozdílu ve struktuře buněčné stěny, se třídí bakterie na grampozitivní bakterie a gramnegativní bakterie. Lze z něj získat informaci o barvitelnosti, velikosti, tvaru a vzájemném uspořádání buněk a v případě endospor o jejich umístění v buňce [20].

Pokud mikroba nelze určit podle morfologie a růstu, využívají se případné rozdíly v metabolismu. Obvykle se testuje okyselení a produkce plynu ze sacharidu (glukóza, laktóza, sacharóza, manitol apod.) jako jediného zdroje uhlíku. Některými testy na speciálních půdách zjišťují konečné produkty, jako je například indol či sirovodík, a enzymové aktivity, například oxidáza, kataláza [20].

Často se také používají jako jedna z dalších metod identifikace soupravy diagnostických testů. Na trhu je jich celá řada. Jsou poněkud nákladnější, ale na druhé straně jsou dostatečně jednoduché i přesné. Vyrábějí se zaměřením na určité skupiny bakterií. Pro analýzu metabolických produktů se užívají i náročnější metody a to poměrně často plynové chromatografie, která má široké užití v identifikaci anaerobních bakterií stanovením těkavých mastných kyselin [20].

Účelem tohoto mikrobiologického vyšetření je obvykle zjistit, který mikrob je příčinou sledovaného onemocnění, jinými slovy, zda je možno prokázat etiologické agens vyšetřované infekce (Obrázek 10). Etiologické agens lze prokázat v infikovaném organismu jednak přímo, jednak nepřímo [18].

Tabulka 1 ukazuje přibližně jednoduché, avšak praktické klasifikační schéma, jež využívá znaků společných několika mikroorganismů. Uvnitř skupin lze pak ještě několika doplňkovými testy dále identifikovat často až na úroveň druhu. Bakterie se klasifikují podobně jako např. prvoci, houby podle týchž pravidel biologické klasifikace (binomické nomenklatury), ale s tím rozdílem, že je nelze identifikovat podle kritérií pro vyšší rostliny a živočichy, neboť se nemnoží pohlavně. Ačkoliv se jako respektovaný referenční zdroj používá „Bergyho manuál systematické bakteriologie“ neexistuje standardní, všeobecně přijatá a všemi uznávaná klasifikace [20]. Základní podmínkou pro provádění identifikace je práce s čistou kulturou, protože ne každý nárůst musí představovat na misce vždy čistou kulturu. Tato problematika se především vyskytuje u izolace selektivním médiem, kde se může vyskytnout přítomná živá, avšak nerostoucí kontaminace poblíž izolovaných kolonií a může dojít k subkultivaci spolu se zvolenou kolonií. Z tohoto důvodu jsou pro identifikaci upřednostňována neselektivní média [20].

Bakterie se rozlišují hlavně podle morfologie a barvení, které slouží jako předběžná kritéria pro zařazení neznámého kmene do příslušné skupiny. Gramovým barvením, jenž je výrazem základního rozdílu ve struktuře buněčné stěny, se třídí bakterie na gramozitivní bakterie a gramnegativní bakterie. Lze z něj získat informaci o barvitelnosti, velikosti, tvaru a vzájemném uspořádání buněk a v případě endospor o jejich umístění v buňce [20].

Pokud mikroba nelze určit podle morfologie a růstu, využívají se případné rozdíly v metabolismu. Obvykle se testuje okyselení a produkce plynu ze sacharidu (glukóza, laktóza, sacharóza, manitol apod.) jako jediného zdroje uhlíku. Některými testy na speciálních půdách zjišťují konečné produkty, jako je například indol či sirovodík, a enzymové aktivity, například oxidáza, kataláza [20].

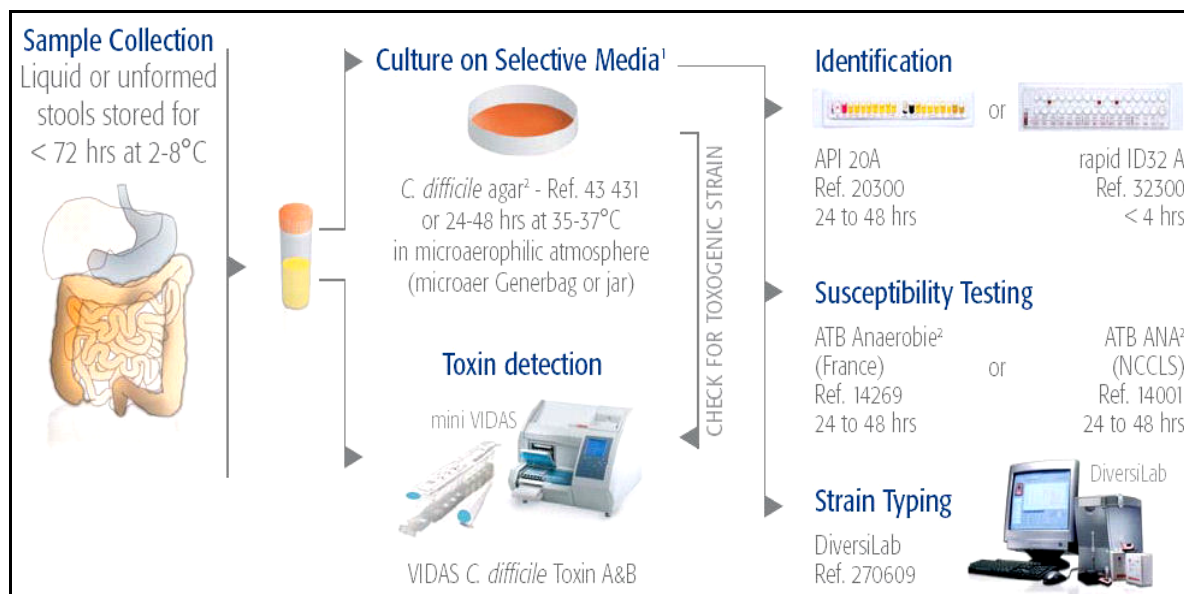
Často se také používají jako jedna z dalších metod identifikace soupravy diagnostických testů. Na trhu je jich celá řada. Jsou poněkud nákladnější, ale na druhé straně jsou dostatečně jednoduché i přesné. Vyrábějí se zaměřením na určité skupiny bakterií. Pro analýzu metabolických produktů se užívají i náročnější metody a to poměrně často plynové chromatografie, která má široké uplatnění v identifikaci anaerobních bakterií stanovením těkavých mastných kyselin [20].

Účelem tohoto mikrobiologického vyšetření je obvykle zjistit, který mikrob je příčinou sledovaného onemocnění, jinými slovy, zda je možno prokázat etiologické agens

vyšetřované infekce (Obrázek 10). Etiologické agens lze prokázat v infikovaném organismu jednak přímo, jednak nepřímo [18].

Tabulka 1. *Identifikační schéma vybraných klinicky důležitých mikroorganismů* [21]

EUKARYOTNÍ RODY
<p>Protozoa:</p> <p>Sporozoa: <i>Plasmodium, Isospora, Toxoplasma, Cryptosporidium</i></p> <p>Bičíkovci: <i>Giardia, Trichomonas, Trypanosoma, Leishmania</i></p> <p>Améby: <i>Entamoeba, Naegleria, Acanthamoeba</i></p> <p>Ostatní: <i>Babesia, Balantidium, Pneumocystis</i></p>
<p>Houby:</p> <p>Plísně: <i>Epidermophyton, Trichophyton, Microsporum</i></p> <p>Kvasinkovité: <i>Candida</i></p>
<p>Dimorfní: <i>Histoplasma, Blastomyces, Coccidioides</i></p> <p>Pravé kvasinky: <i>Cryptococcus</i></p>
PROKARYOTNÍ RODY
<p>Vláknité bakterie: <i>Actinomyces, Nocardia, Streptomyces, Mycobacterium</i></p>
<p>„Pravé bakterie“:</p> <p>Grampozitivní bakterie:</p> <p>aeroby: <i>Corynebacterium, Listeria, Bacillus</i></p> <p>anaeroby: <i>Clostridium, Lactobacillus, Eubacterium</i></p> <p>Grampozitivní koky: <i>Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus</i></p> <p>Gramnegativní koky:</p> <p>aeroby: <i>Neisseria</i></p> <p>anaeroby: <i>Veillonella</i></p> <p>Gramnegativní bakterie:</p> <p>aeroby: Enterobakterie - <i>Escherichia, Klebsiella, Proteus, Salmonella</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Pseudomonády - <i>Pseudomonas, Alcaligenes</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Parvobakterie - <i>Haemophilus, Bordetella, Brucella, Pasteurella, Yersinia</i></p> <p>anaeroby: <i>Bacteroides, Fusobacterium</i></p> <p>Gramnegativní vibria: <i>Vibrio, Spirillum, Campylobacter, Helicobacter</i></p>
<p>Spirochety: <i>Borrelia, Treponema, Leptospira</i></p>
<p>Mykoplazmata: <i>Mycoplasma, Ureaplasma</i></p>
<p>Rickettsie a chlamydie: <i>Rickettsia, Coxiella, Rochalimaea, Chlamydia</i></p>



Obrázek 10: Navržený postup pro vyšetření vzorků s podezřením na výskyt *Clostridium difficile* [56]

2.1.1 Přímé metody:

Přímý průkaz spočívá v nález mikroba ve vyšetřovaném vzorku. Mezi přímé metody náleží zejména mikroskopická detekce. Dále jsou to v každodenní mikrobiologické praxi běžně používané kultivační metody, kvalitativní testy (diskový difusní test, antibiogramové testy), kvantitativní testy (agarová diluční metoda, metoda mikrodiluční), molekulární metody (PCR, RFLP, sekvencování DNA) a také lze zde zařadit tzv. biochemické testy [14], [18].

2.1.2 Nepřímé metody

Nepřímým průkazem rozumíme průkaz infekčního agens podle nález stop, které zanechalo v organismu, tedy podle přítomnosti protilátek (serologický průkaz). Jedná se o reakce mezi antigeny a protilátkami *in vitro*. Protilátky dokazujeme obvykle v krevním séru. Každá serologická reakce lze využít dvojnásobným způsobem. K průkazu protilátek nebo k průkazu antigenu [18].

K důkazu protilátek musíme mít k dispozici známý antigen. Přidáme-li ho k séru vyšetřovaného jedince, pak na základě proběhlé serologické reakce dokážeme v séru přítomnost protilátek. Naopak k důkazu antigenu používáme sérum o známém obsahu protilátek (tzv. antisérum). Na základě proběhlé serologické reakce se pak prokazuje přítomnost

antigenu. Po mikrobiálních antigenech můžeme pátrat jednak přímo ve vyšetřovaném vzorku, jednak při zkoumání již vypěstovaného neznámého mikroba. Tento důkaz je možné brát jako tzv. antigenní analýzu a je součástí identifikačních postupů [18].

Jako antigeny slouží celé mikroby nebo jejich části (pouzdra, bičíky, extrakty různých kultur), resp. jejich produkty (enzymy, toxiny). Většina serologických testů je k dispozici komerčně, jen některé si laboratoře připravují samy. Problémy tu bývají s kontrolou jakosti antigenů, neboť různé šarže se mohou od sebe značně lišit [18].

Serologické reakce probíhají ve dvou fázích. V prvním dojde ke specifické vazbě mezi vazebnými místy protilátky a odpovídajícími antigenními determinantami (epitopy). Druhá fáze je nespecifická a její průběh závisí na charakteru prostředí (zvláště na přítomnosti iontů) a na druhu antigenu. Podle charakteru antigenu a vlastního postupu rozdělujeme serologické reakce na precipitaci, vazbu komplementu, neutralizaci, reakce se zmíněnými složkami apod. [18].

2.2 Kultivace

Vzhledem k malým rozměrům mikroorganismů, jejichž vlastnosti jsou těžko stanovitelné u jednotlivých buněk, tak dochází k jejich kultivaci ve vhodných médiích. Takto získané populace jsou tvořené tisíce až miliony jednotlivých buněk [19]. Kultivace je nejdůležitější diagnostickou metodou přímého průkazu většiny bakterií. Mikroorganismy se kultivují z různých důvodů [19]. Cílem kultivace je získání tzv. čisté kultury, složené z bakterií stejného rodu i druhu [18]. Čistou kulturou užijeme k bližšímu určení bakterií jinými diagnostickými metodami, například biochemickými metoda, fyzikálními a fyzikálně-chemickými podmínkami kultivace [19].

V diagnostice bakterií užíváme tzv. kultivace statické, kdy bakterie narostou v ohraničeném množství kultivační půdy, např. ve zkumavce nebo Petriho misce. Jejich růst probíhá podle kultivační křivky, kterou lze matematicky definovat. Po vyčerpání živin nebo po nahromadění metabolitů, které je obvykle spojeno s posunem pH, se růst zastavuje. Bakterie na stejné kultivační půdě vytvoří za stejnou dobu morfologicky stejné nebo podobné kolonie. Podle jejich vzhledu můžeme některé bakterie zařadit do rodu nebo zúžit široké spektrum metod dalšího určování. Kromě tohoto základního zařazení do rodu lze zjistit, zda se jedná o jeden druh či několik druhů nebo rodů bakterií [18]. Může se také

jednat o zachycení jednotlivých buněk, jejich izolaci či identifikaci nebo stanovení jejich metabolismu či získání jejich biomasy nebo metabolitu [19].

V mikrobiologické praxi rozlišujeme statické a kontinuální kultivace a hloubkové kultivace. Statická kultivace spočívá v tom, že se bakterie rozmnožují v určitém ohraničeném objemu, z kterého čerpají živiny a do kterého vylučují své metabolity. Po dosažení určité koncentrace metabolitů, vyčerpání určité části živin a dosažení určitého pH prostředí se bakterie přestanou rozmnožovat. Příkladem modifikace této kultivace je submerzní (hloubková) kultivace. Podstata spočívá v tom, že v omezeném objemu dochází k urychlení metabolismu a rychlejšímu dosáhnutí vyšší koncentrace kultury. Tyto kultury jsou rovněž několikrát promíchávány a provzdušivávány. Používá se například při výrobě antibiotik [19],[48].

Kontinuální kultivace se používá při výrobě metabolitů a získání co nejbohatší biomasy. Její princip spočívá v tom, že se ve vhodné aparatuře trvale dodávají k rostoucí a množící se kultuře potřebné živiny a zároveň se odvádějí zplodiny, které by brzdily růst a rozmnožování bakterií. Za takovýchto podmínek se kultura bakterií udržuje v trvalé exponenciální fázi rozmnožování [48].

Složení kultivačních půd je rozdílné a musí vyhovovat všem nárokům na živiny a zároveň musí mikroorganismům poskytovat podobné prostředí, jaké mají v přirozených substrátech, v nichž se přírodě vyskytují a rostou. Neexistuje univerzální kultivační médium, které by umožňovalo kultivovat všechny druhy mikroorganismu. Proto bychom měli zvolit takové médium, které zajistí selektivní pomnožení určitého mikroorganismu, zatímco nežádoucí druhy jsou v růstu potlačeny. Kultivační médium je složeno z nejrůznějších ingrediencí (zdroje energie, uhlíku, dusíku a ostatních biogenních a stopových prvků). Pro náročnější druhy mikroorganismů a speciální diagnostické účely jsou pak půdy ještě obohaceny růstovými faktory (vitaminy, aminokyselinami), případně nadbytkem některých solí. Jeho volba závisí nejen na druhu mikroorganismu, ale i na účelu kultivace. Požadavky na živiny jsou u různých mikroorganismů různé [13].

Obecně lze říci, že saprofytické druhy mají nároky na kultivaci skromnější než parazitické bakterie. Zároveň saprofytické druhy bývají odolnější vůči nepříznivým vnějším vlivům a obvykle jsou také rezistentní na řadu antibiotik. Naproti tomu bakterie s vysokým

stupněm parazitismu bývají kultivačně značně náročné, přičemž jejich odolnost a resistance na antibiotika je obvykle nízká [18].

Přítomnost anaerobních sporotvorných bakterií se nejčastěji zjišťuje kultivací ve vysoké vrstvě agarové půdy ve zkumavce nebo v tekuté půdě ve zkumavce převrstvené 3-10 mm vrstvou sterilního parafínu. Tento postup se používá také při zjišťování anaerobů v mase, hlavně mletém, či v uzeninách. Jelikož se jedná o zjišťování přítomnosti vegetativních buněk anaerobů, nepoužívá se tepelná inaktivace [41].

Půdy, které jsou určeny pro kultivaci bakterií lze rozdělit podle celé řady kritérií. Půdy lze rozdělit podle původu, podle složení, podle konzistence, nebo podle funkce [18].

2.2.1 Dělení půd

Podle původu lze rozdělit na půdy, které si samy laboratoře připravují a půdy předem komerčně připravené, tzv. umělé půdy. Tyto půdy jsou dodávány v suchém stavu a nebo jsou dodávány již rozlité ve zkumavkách či Petriho miskách [18].

Podle složení se užívají půdy, které mají předem definované složení a kde je detailně známo chemické složení. V laboratořích mikrobiologie se často používají tzv. komplexních půd, kdy je definována přesně jen receptura (např. pepton, masový extrakt) [18].

Podle konzistence dělíme půdy na pevné, tekuté a polotuhé. Tekuté půdy slouží především pro pomnožení bakterií, nedovolují však získat čistou kulturu nutnou pro bližší určení mikroba. Pevné půdy se při diagnostice používají častěji. Růst se projevuje tvorbou kolonií, podle kterých můžeme orientačně určit, zda se jedná o jeden nebo více druhů bakterií. Hlavně tím získáváme čistou kulturu nezbytnou pro další podrobné určení [18].

Tuhé půdy se připravují z půd tekutých přidáním agaru, méně často želatiny. Agar není využíván bakteriemi jako živina a přidává se přibližně v koncentraci 1-2 %. Polotuhé půdy vzniknou přidáním menšího podílu agaru do tekuté půdy a slouží k růstu některých, na kultivaci náročných, bakterií nebo k testování produkce některých metabolitů [18].

Podle funkce lze půdy rozdělit na základní, selektivní, diagnostické, selektivně diagnostické, pomnožovací, transportní a půdy se sníženým redox-potenciálem [18].

Základní půdou, ze které se připravují ostatní půdy je masopeptonový bujon. Bujon je složen z masového extraktu - z peptonu, což je směs peptidů a z malého množství NaCl.

Přidáním 1-2% agaru vznikne z bujonu masopeptonový agar. K těmto základním půdám přidáváme složky, které půdu obohacují např. o cukry, růstové faktory, krev, čímž vznikají půdy obohacené [18].

Půdy selektivní obsahují látky potlačující růst některých skupin bakterií, ale nebrání růstu těch, které mají být izolovány. Například se přidávají antibiotika, barviva, žluč, vyšší koncentrace soli a některé další sloučeniny. Mezi půdy selektivní řadíme například krevní agar s 10% NaCl pro záchyt stafylokoků [18].

Půdy diagnostické vzniknou z půd základních přidáním složek, které různě reagují na způsob metabolismu. Výsledkem je pak odlišný růst jednotlivých rodů nebo druhů bakterií. Do této skupiny patří např. krevní agar, na kterém pak sledujeme rozdílné hemolytické vlastnosti bakterií. Patří sem také většina půd uznávaných pro biochemické určení mikrobů. Půdy selektivně-diagnostické jsou kombinací obou předchozích skupin. Patří sem např. Endova půda [18].

Půdy pomnožovací jsou většinou tekuté, slouží k pomnožení bakterií, kde jsou přítomny v malém množství. Patří sem např. půda selenitová, sloužící pro selektivní pomnožení salmonel, nebo mozko-srdcova infuze pro kultivaci náročnějších bakterií [18], [36].

Půdy transportní jsou obvykle připraveny ve zkumavkách. Neobsahují živiny a slouží pouze k zajištění přežití bakterií během transportu bakterií do laboratoře [18].

Půdy se sníženým redox-potenciálem se používají ke kultivaci anaerobních bakterií a fakultativně anaerobních bakterií. Oxidoredukční potenciál má pro anaerobní bakterie přibližnou hodnotu -200 mV a pro fakultativně anaerobní bakterie +300 mV [18]. Pro kultivaci anaerobních bakterií se používají kultivační půdy jako je neselektivní anaerobní krevní agar, selektivní anaerobní krevní agar (s kyselinou nalidixovou a kolistinem) pro izolaci grampozitivních anaerobních bakterií, selektivní anaerobní krevní agar (s kyselinou nalidixovou a vankomycinem) pro izolaci gramnegativních anaerobních bakterií a anaerobní tekutá pomnožovací půda, převrstvená parafinovým olejem [12].

2.2.2 Složky kultivačních půd

- a) Voda

Voda je nezbytnou součástí živé hmoty, její molekuly jsou kritickou složkou biochemických reakcí a přispívají ke stabilitě makromolekul. Také se podílejí na strukturální organizaci buňky. K tomu je voda uzpůsobená svým polárním uspořádáním [36].

Voda je základní složkou a součástí všech živých půd. Předpokládá se používání vody destilované či deionizované. Pro přípravu základní půdy postačí voda obyčejná, která neobsahuje nadměrné množství kovových iontů. Většinou se však připravují půdy už z hotových komerčních základů, kdy k rehydrataci je zapotřebí voda destilovaná či deionizovaná [36].

b) Živiny

Za živiny pokládáme látky, které mikrobům slouží jako zdroj uhlíku a dusíku. Jen málo mikrobů dokáže využít složité bílkoviny. Musíme je tedy předkládat rozložené na polypeptidy, peptidy až na jednotlivé aminokyseliny. Jako živiny slouží například extrakty z masa, enzymatické bílkovinné štěpy peptony či jiné hydrolyzáty [36].

Peptony jsou ve vodě rozpustné produkty enzymatické hydrolýzy bílkovin. Jako zdroj slouží například mléčný kasein, sója, zbytky po lisování oleje apod. K natrávení těchto surovin slouží většinou papain, pankreatin, pepsin. Výsledkem jsou peptony lišící se dle užitého enzymu molekulovou hmotností [36].

c) Zdroje energie

Jako nejsnáze přístupný zdroj energie slouží glukosa, či jiné snadno využitelné sacharidy (zejména mono- a disacharidy). Jako zdroj energie slouží například i peptony či aminokyseliny [18].

d) Minerální látky

Jen vzácně je nutno půdy doplňovat minerálními látkami, případně vitaminy nebo jinými koenzymy a kofaktory. Běžným zdrojem minerálních látek je pro většinu bakterií masový extrakt. Jako zdroj vitamínu B lze použít kvasničný extrakt. Další, mnohdy špatně definovatelné směsi komplexních, často termolabilních, látek jsou přítomny v krvi nebo v krevním séru. U některých mikrobů slouží tyto látky jako ochranný zdroj například proti toxickým kyslíkovým radikálům [36].

e) Selektivně působící látky:

Selektivně působící látky zabezpečují růstové podmínky jen pro určité organismy, ale znemožňují, až zastavují růst jiných organismů. Přidávají se do média, která se používají na selekci a diferenciaci mikroorganismů [19]. Mezi selektivně působící látky lze zařadit např. barviva, indikátory nebo antibiotika a chemoterapeutika [19].

Do kultivačních médií se mohou přidávat barviva jako indikátory. Jejich barevná změna je charakteristická pro určitý rozsah pH (E_n). Na základě specifických metabolických charakteristik umožňují rozlišit mikroorganismy. Mohou reagovat s metabolickým produktem, který tvoří určitý mikroorganismus. Takovéto reakce zapříčiňují změny barvy média nebo vzhledu kolonie. Nejvíce používanými indikátory jsou fenolová červeň, bromthymolová modř, bromkrezolová modř, neutrální červeň, thymolová modř a lakmus. Indukují produkci kyselin ze sacharidů [19]. Methylenová modř, resazurin a nilská modř jsou redoxní indikátory, jejich barevná změna indikuje přítomnost nebo nepřítomnost kyslíku [19].

Barviva jako krystalová violet, brilantová zeleň, akridinová oranž, rhodanid draselný nebo žlučová barviva inhibují růst grampozitivních mikroorganismů. Chlorid sodný, bismuticitrát, selenit, chlorid lithný, teluričnan draselný, žlučové soli, zejména deoxycholát, chlorid sodný a další soli například tetrazoliové soli se používají na selekci a diferenciaci hlavně patogenních mikroorganismů [19].

Antibiotika a chemoterapeutika tvoří skupinu selektivně působících látek. Termostabilní jsou například chloramfenikol, cyklohexidin, sulfoamidy, které se mohou přidávat do média před sterilizací. Benzylpenicilin, streptomycin a jiné méně stabilní látky se sterilně (asepticky) přidávají do médií až po sterilizaci. Na potlačení růstu grampozitivních bakterií je možné použít i aniontové povrchově aktivní látky [19].

f) Pufry

Většina mikrobů při kultivaci v uzavřených laboratorních systémech (zkumavka s bujonem) vylučuje do média produkty metabolismu, obvykle kyselé povahy. Po vyčerpání kapacity tlumivé funkce média, pH média klesne a růst se zastaví. Rychle k tomu dochází v půdách obsahující sacharidy. Přílišná koncentrace pufrů, zvláště fosfátů, může mít za následek jejich vysrážení, případně odstranění stopových minerálů, zvláště kovů [36].

g) Prostředky na odpěňování živných médií

Půdy bohaté na nativní látky při submerzních procesech kultivace pění. Na odstranění pění se používají prostředky, které snižují povrchové napětí kapalin, například minerální nebo rostlinné oleje (sójový, řepkový, kokosový, slunečnicový). Může se přidávat i lůj či jiný tuk. Ve fermentačních procesech se přirozené oleje a tuky využívají jako zdroj uhlíku. Jiné látky na odpěňování jsou například vyšší alkoholy (oktadekanol), polyglykoly a alkylové alkoholy. Silikonové oleje jsou specifické pro jednobuněčné mikroorganismy. Silikonové emulze jsou velmi účinné a mikroorganismy je nezutilizují [19].

2.2.3 Podmínky kultivace

2.2.3.1 Teplota

Životní funkce organismů může probíhat v teplotním pásmu růstu mikroorganismů ohraničeném minimální a maximální teplotou [19].

Minimální teplota je nejnižší teplota, při které metabolismus pokračuje ještě zjištěnou rychlostí. Životní činnost se může zastavit, některé organismy hynou, ale většina z nich si zachovává svou životaschopnost [19].

Optimální teplota je spojena s nejvyšší rychlostí rozmnožování a metabolickou aktivitou mikroorganismů, přičemž některé procesy (např. sporulace, tvorba některých metabolitů a jiné) si mohou vyžádat svoji optimální teplotu [19].

Při maximální teplotě je organismus schopný se rozmnožovat, ale postupně dochází k jeho zpomalení až zastavení. Vlivem denaturace enzymů následně prudce klesá rychlost rozmnožování a další zvýšení teploty nad určitou mez působí na buňku letálně. Maximální teploty jsou u prokaryotických mikroorganismů vyšší než u eukaryotických. Ale i tady platí, že čím složitější mikroorganismus, tím nižší je maximální teplota, kterou snese. Rozsah teplotního pásma u saprofytických mikroorganismů je široký. Naopak patogeny disponují úzkým teplotním rozsahem [19].

Podle teplotního pásma růstu se mikroorganismy dělí na psychrofilní, mezofilní, termofilní [19]. Psychrofilní mikroorganismy vykazují optimální růst při teplotě nižší než 16 °C a nejintenzivněji rostou při teplotách v rozsahu 0 – 5 °C [19,26]. Některé z nich rostou při teplotě nižší než -10 °C (např. vláknité houby). Generační doba těchto mikroorganismů dosahuje obvykle hodnot delších než 48 hodin. Výzkumy prokázaly, že podstatou

tohoto fyziologického jevu je skutečnost, že jejich vnitrobuněčná voda je i při velmi nízkých teplotách v kapalném stavu. Psychofilní mikroorganismy se vyskytují v permanentně zmrzlých půdách, chladných vodách a způsobují rozklad masa, kažení mléčných výrobků a jiných potravin uchovávaných při nízkých teplotách [26].

Psychrotrofní mikroorganismy, na rozdíl od psychofilních mikroorganismů, jsou schopné růst při 0°C. Rozmnožují se díky vysokému osmotickému tlaku uvnitř buněk, neboť voda uvnitř těchto buněk je v kapalném stavu. Mezi tento typ mikroorganismů patří například *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, z hub například *Fusarium*, *Botrytis* [19, [26]. Psychofilní a psychrotrofní mikroorganismy se nejčastěji kultivují při 4-7 °C, 5 až 10 dní v chladničce s minimem přístupu vzduchu [19].

Mezofilní mikroorganismy rostou v rozmezí teplot 0 – 40 °C, při zvýšení na teplotu 45°C přestávají růst [19]. Bakterie z této skupiny mikroorganismů vyžadují pro optimální růst nejčastěji teplotu kolem 37 °C. Kvasinky a plísňe se rozmnožují kolem 30 °C, patogenní houby pak kolem 28 °C [26]. Náleží zde naprostá většina saprofytických druhů [19], [26].

Mikroorganismy, které dokáží růst při teplotě vyšší než 45 °C se řadí mezi tzv. termorezistentní mikroorganismy a přežívají teplotu až 60-63 °C [19], [26]. Nejčastější je popsán optimální růst a dělení termofilů při 50 °C až 60 °C. Některé extrémofilní mikroorganismy rostoucí i při teplotách kolem 80 °C. Řada termofilních mikroorganismů se však nerozmnožuje při teplotě nižší než 40 °C. Termofilní bakterie mají i zástupce v rodu *Clostridium*. Vyskytují se v přírodě v horkých pramenech, kompostech, trávicím ústrojí živočichů, v uskladněných vlhkých materiálech. Dokonce ve velmi vařící mořské vodě okolo 300 °C se zjistila přítomnost kolonií těchto bakterií. K jejich usmrcení došlo ochlazením na bod varu. Některé z nich mají důležitý význam v potravinářství [26].

2.2.3.2 Světlo

Fyziologický účinek světla na mikroorganismy závisí na množství světla pohlceného buňkou a na jeho energii, která je nepřímo úměrná vlnové délce světla. Světlo o vlnové délce 250 až 1100 nm může pozitivně či negativně ovlivnit aktivitu buněk [19].

2.2.3.3 pH média během kultivace

Jednou z důležitých podmínek pro dosažení optimálních podmínek a biochemické aktivity mikroorganismů je dodržení optimální koncentrace vodíkových iontů v médiu. Každý organismus vyžaduje pro činnost životně důležitých enzymů určité optimální rozmezí pH. Extrémní hodnoty je totiž mohou ohrozit, neboť koncentrace vodíkových iontů ovlivňuje nejen aktivitu extracelulárních enzymů a funkce cytoplazmatické membrány, ale je zejména spjata s mechanismem transportu látek. Většina bakterií roste v neutrálním až slabě kyselém nebo alkalickém prostředí [19].

Aby se zabránilo nadměrným změnám koncentrace vodíkových iontů, přidávají se do média tlumivé roztoky solí slabých kyselin (fosforečnany, octany), nerozpustné uhličitany, proteiny a jejich degradační produkty, které udržují pH kolem 6,8, tj. v blízkosti neutrální hodnoty [19].

2.2.3.4 Oxidačně-redukční potenciál (E_h)

V prostředí, ve kterém se vyskytují oxidační a redukční látky vzniká určité napětí – tzv. oxidačně-redukční potenciál. Růst aerobních i anaerobních mikroorganismů závisí nejen na přítomnosti a nepřítomnosti kyslíku, ale zejména na oxido-redukčních podmínkách kultivačního média. Pro srovnání aerobní bakterie rostou při pozitivních hodnotách oxidačně-redukčního potenciálu v rozmezí +200 až +400 mV při pH 7. Obligátně anaerobní bakterie začínají růst při hodnotách -200 až -250 mV, kdy konečný potenciál může být až -400 mV. Pro snížení hodnoty potenciálů a jeho regulace se do média přidávají redukující látky (cystein, kyselina thioglykolová). V těchto médiích rostou anaerobní bakterie i v přítomnosti kyslíku [19].

Změna oxidačního-redukčního potenciálů má velký vliv na intenzitu růstu a charakter biochemických procesů. Během růstu mikroorganismů nastává změna redoxního potenciálů tvorbou metabolitů. Aby nedocházelo k inhibici některých metabolických procesů, musí se redoxní potenciál regulovat [19].

V mikrobiologii se na určování oxidačně-redukčního potenciálů používají barviva. Na počátku jsou zbarvené v oxidačním stavu a při určité hodnotě redoxního potenciálu nastává barevná změna anebo dokonce zmizení barvy [19].

Tabulka 2: *Indikátory redoxního potenciálu* [19]

Oxidačně-redukční potenciál	Barvivo	E_h (mV) při pH 7
začáteční	Methylenová modř	a. 6
	Resazurin	b. 42
	Nilská modř	c. 160
	Indigokarmín	d. 230
konečný	Janusova zeleň	e. 252
	Neutrální červeň	f. 344
	Safranin	g. 389

2.2.3.5 Délka kultivace

Kultivaci ovlivňuje taky její doba. Anaerobní bakterie a kvasinky vyžadují obvykle dobu kultivace dlouhou 2 – 5 dnů. Naproti tomu většina aerobních a fakultativně aerobních bakterií naroste na pevných půdách za 16-20 hodin [18].

2.2.4 Anaerobní kultivace

Společnou vlastností anaerobních bakterií je neschopnost růstu za přítomnosti kyslíku a rozdělení na dvě odlišné skupiny, a to sporulující a nesporulující anaerobní bakterie. Pro anaerobní kultivaci je nutno zajistit anaerobní prostředí, tj. prostředí bez kyslíku anebo s nízkým redoxním potenciálem [11].

Anaeroby využívají kyslík, který je vázaný v dusičnanech, síranech a sacharidech. V přítomnosti molekulárního kyslíku se v nich blokuje jeden z některých životně důležitých enzymů, který může být funkční jen při nízké hodnotě E_h . Některé anaerobní bakterie nemají enzymy (katalasa, cytochromoxidasa), které jsou potřebné při aerobním rozkladu glukózy až na vodu a CO_2 . V důsledku toho se v kulturách hromadí peroxid vodíku, který je pro buňky toxický [19].

Ve srovnání s bakteriemi fakultativně anaerobními, které sice kyslík k svému metabolismu nevyžadují, ale tolerují jej, jsou striktně anaerobní bakterie nejen při kultivaci, ale i při jejich přechovávání usmrceny, neboť přítomnost kyslíku je pro ně toxická [11].

Klostridie jakožto anaerobní bakterie vyžadují ke svému růstu nižší redoxní potenciál prostředí (kolem -100 mV až -200 mV), který umožňuje fungování enzymů účastnících se oxidačně-redukčních procesů v buňce, tzv. ferredoxinů. Z tohoto důvodu se právě pro klostridie používají půdy s vyšším obsahem redukujících látek, např. Wilkinsův-Chalgrenův agar. Většinu patogenních druhů však lze kultivovat v anaerobní atmosféře i na běžném krevním agaru [20], [21].

Pro úspěšnou práci s anaerobními mikroorganismy lze použít skříně, ve kterých je stále udržováno anaerobní prostředí. Materiál se vkládá dovnitř i vyjímá ven přes speciální komory. Toto zařízení dovolí pracovat s materiálem i kulturami tak, že nejsou vystaveny účinkům kyslíku a záchytnost bakterií je daleko vyšší. Kyslík, který vnikne dovnitř je většinou odstraňován katalytickou hydrogenací reakcí vodíkem [11]. Také je možné pro zamezení přístupu kyslíku používat hermeticky uzavíratelné nádoby [18].

Anaerobní kultivace je sama o sobě časově i finančně poměrně náročná, izolace identifikovaných kultur často také. Mezi základní kultivační médium pro anaeroby se používá médium VL (maso-kvasničné médium), médium VF (maso-játrové médium) nebo thioglykolátové médium [18], [36]. Pro striktně anaerobní bakterie se zabezpečují podmínky bez kyslíku kombinací fyzikálních a chemických metod [18].

Mezi fyzikální metody, které se běžně používají ke kultivaci anaerobních bakterií lze zařadit použití anaerostatu ve vakuovém exsikátoru, ze kterého je pomocí vakua odstraněn vzduch a nahrazen inertní atmosférou [18]. Anaerostat je válcovitá nádoba z odolného materiálu s víkem, do které vložíme až 12 Petriho misek, sáčků s vhodnými chemikáliemi a katalyzátorem [17].

Použitím anaerostatu se tak dosáhne anaerobních podmínek pro kultivaci. Plyn se vyměňuje dvakrát až třikrát, aby se odstranily veškeré stopy po kyslíku. Na tvorbu inertní atmosféry se používá dusík, vodík, oxid uhličitý anebo jejich směsi. Plyny se pečlivě čistí od stop kyslíku pomocí vanadiových katalyzátorů, kdy se nechává dusík přebublávat přes kyselý roztok síranu chromito-draselného nebo také je možné použít čerstvý roztok alkalického pyrogalolu. Pro kontrolu anaerobních podmínek se vkládá do anaerostatu spolu s kulturou také zkumavka s odbarveným redoxním indikátorem. Pokud dojde k zbarvení, signalizuje to přítomnost kyslíku. Petriho misky se neinkubují dnem vzhůru, aby nedošlo k odchlípnutí agarové vrstvy. Pro chemické metody je typické používání alkalického pyro-

galolu jako absorbentu kyslíku, a to ve formě roztoku nebo suché alkalické směsi, např. Anaerocultu [18].

Pokud nelze určit mikroorganismus pomocí morfologie a růstu, využívají se případné rozdíly v metabolismu [19]. Tato biologická metoda je založena na schopnosti některých mikroorganismů spotřebovávat kyslík v průběhu svého růstu. Anaerobiózy se dosáhne po 12 hodinách inkubace. Tento druh kultivace je ale vhodnější pro druhy méně náročné na bezkyslíkaté prostředí, kdy dokážou poměrně dlouho přežít v přítomnosti kyslíku [18].

2.2.5 Používaný postup pro anaerobní kultivaci

První a nejdůležitější krok je zbavit půdu přítomného kyslíku. Většinou se děje po vaření. Následuje rychlé zchlazení na teplotu 42 °C. Dále proběhne naočkování zvoleným inokulem, které se ihned zalévá asi 3 až 4 cm hrubou vrstvou sterilního média nebo sterilním parafínem (vazelinou či parafínovým olejem) [18]. Tato procedura se nedoporučuje dvakrát opakovat. Také jednou regenerované, ale nepoužité půdy je třeba vyřadit. Pevné půdy k anaerobní kultivaci se doporučuje mít uložené v anaerobní atmosféře [36].

Sporotvorné bakterie se mohou očkovat přímo do horkého média, čímž dojde k odstranění vegetativních buněk. Následně dochází k ochlazení ve vodní lázni. Pro zabránění proniknutí nežádoucího kyslíku dovnitř se musí nádoby co nejdříve dobře uzavřít. Proto je vhodné používat hermeticky uzavíratelné nádoby [18].

Po naočkování biologickým materiálem na kultivační půdy pro mikroaerofilní a anaerobní kultivaci jsou půdy následně vloženy do anaerobního boxu se směsí plynů: 80 % N₂, 10 % CO₂, 10 % H₂ [18]. Dále pokračuje kultivace původních ploten, kdy dochází po 24 a 48 hodinách k další kontrole. Při negativním výsledku je kultivace prodloužena [12].

Výsledky jsou pak hodnoceny za 24 a 48 hodin, případně pro pomalý růst i déle. Naopak u rychle rostoucích anaerobních bakterií lze identifikace dosáhnout již třetí den po naočkování biologického materiálu [12].

2.3 Identifikace bakterií

Předběžná identifikace bakterií, která je založená na makroskopické a mikroskopické morfologii a výsledku jednoduchých testů se používá nejčastěji pro tzv. izolované anaerobní

roby. Tato metoda je v mnoha případech dostačující a může být i konečnou verzí pro identifikaci anaerobů v klinické praxi. Výhodná je i pro její poměrně vysokou rychlost určení a nízkou cenu vyšetření [12].

K vlastní identifikaci bakterií lze buď využít komerčních biochemických souprav, kdy úspěšnost identifikace je dána databází systému nebo jednoduchých testů, které umožní předběžnou identifikaci. U závažných izolátů je možné kombinovat oba způsoby, což může pomoci při nepřesvědčivém výsledku identifikace pomocí komerční soupravy. V současné době nabývá na významu v odůvodněných případech i identifikace izolovaných kultur pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) [12].

2.3.1 Identifikace pomocí biochemických testů

K identifikaci mikroorganismů nestačí pouze určení pomocí morfologických mikroskopických a makroskopických znaků. Pro dobré určení je třeba zajistit celou řadu fyziologických vlastností mikroorganismů, které lze stanovit pomocí jednoduchých biochemických testů zakládajících se na rozdílné enzymové výbavě jednotlivých skupin mikroorganismů [13].

Biochemické určení bakterií spočívá v testování dostatečného množství biochemických testů (reakcí), které umožní jejich vzájemné rozlišení. V taxonomických studiích se užívá až několik desítek testů, v diagnostické praxi činí počet těchto testů asi 8 až 24. Vychází se z čisté kultury bakterií, získané přímou kultivací. Bakterie se resuspendují ve fyziologickém roztoku nebo jiném médiu na doporučenou hustotu zákalu, měřeného v McFarlandově stupnici. Pak dochází k naočkování vzniklé suspenze do různých diagnostických půd [18].

Po vhodné době kultivace dochází k nárůstu bakterií. Často se k některým z médií v závislosti na očekávaném výsledku přidává vhodné reagens. Odlišný metabolismus mikroorganismů se projeví tvorbou určitých výsledných produktů podle typu reakce, například produkcí plynu, tvorbou sraženiny apod.. Toto vše může být doprovázeno změnou barvy půdy, která je u většiny půd viditelná pouhým okem, u některých teprve po ozáření UV světlem [18].

Mezi základní biochemické testy bakterií patří například fermentace různých cukrů, tvorba indolu, tvorba β -galaktosidázy, sirovodíku, acetoinu, dekarboxylace aminokyselin,

štěpení močoviny, utilizace citrátu, tvorba katalázy, cytochromoxidázy a jiných. Na závěr se získané výsledky porovnávají s výsledky v diagnostické tabulce. Současně se použijí i výsledky hodnocení makroskopických a mikroskopických znaků pro celkové určení příslušného mikroorganismu. V praxi se často stává, že příslušný mikroorganismus nelze jednoznačně určit, neboť vyizolované mikroorganismy z přirozeného prostředí nemají tytéž vlastnosti jako sbírkové kmeny a nemusí se s nimi v jednom či více znacích shodovat [18].

Biochemické testy se většinou provádějí v tekutých médiích ve zkumavkách, případně na šikmých agarích nebo na Petriho miskách. Soubor testů se nazývá pestrá řada, neboť při pozitivních reakcích dochází díky přidaným indikátorům k již zmíněným změnám zbarvení médií [18].

2.3.2 Nejčastěji užívané biochemické testy

- a. tvorba sirovodíku (H_2S) se detekuje na půdě podle Hajny (červený šikmý agar). Půda se naočkuje vpichem. Tvoří-li bakterie sirovodík, reaguje tento s trojmocnými solemi železa za vzniku černého zbarvení.
- b. štěpení glukózy (GLU), laktózy (LAC), sacharózy (SUC), trehalózy (TRE), manitolu (MAN), inositolu (INO) a dalších cukrů a alkoholů se sleduje v půdách, jejichž základem je protonová voda. Štěpením cukru vznikají obvykle kyselé produkty, které se projeví změnou barvy indikátoru pH v půdě (vznik žlutého zbarvení).
- c. dekarboxylace aminokyselin ornithinu (ORN), lysinu (LYS) a argininu (ARG) jsou často užívané při diagnostice enterobakterií. Z aminokyselin se odštěpí CO_2 a vzniká amin. Výsledné zbarvení bývá fialové, nebo tmavě modré. Pozitivní lysin-dekarboxyláza je typická pro salmonely.
- d. tvorba indolu (IND) se prokazuje v čiré půdě nebo v kombinované půdě MIU. Indol se tvoří štěpením tryptofanu. Po přidání Kovácsova reagensu vzniká červené zbarvení. Pozitivní reakce je typická např. pro *E. coli*.
- e. utilizace citrátu dle Simmonse (SCI). Některé bakterie jsou schopné místo cukru využívat i citrát. Šikmý agar zelené barvy v pozitivním případě zmodrá. Pozitivní reakce je typická pro bakterie rodů *Citrobacter* nebo *Serratia*.

- f. štěpení urey (URE) nastává u bakterií produkujících ureázu, enzym štěpící močovinu. Pozitivní test je typický například pro bakterie *Proteus*. Projevuje se obvykle červeným zbarvením.
- g. průkaz β -galaktozidázy (ONPG). V diagnostice se užívá komerčně vyráběných proužků papíru napuštěného o-nitro-fenylpyranosidem. Proužek se ponořuje do suspenze bakterií ve fyziologickém roztoku. Pozitivní výsledek – vznik žlutého zbarvení, je charakteristické pro rod *Citrobacter*, negativní pro *Salmonella*.
- h. cytochromoxidázový test (OXI) slouží k průkazu oxidázové aktivity. Proužek papíru napuštěný vhodným reagens se přiloží přímo na testované kolonie. Do 2 minut dojde k intenzivnímu zmodrání proužku. Pozitivní test je typický pro neisserie a pseudomonády.

redukce dusičnanů (NIT) se zjišťuje ve žluté, tekuté půdě. Po přidání reagens vzniká červené zbarvení. Pozitivní reakce je typická pro stafylokoky [18].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 MOŽNOSTI DETEKCE BAKTERIÍ RODU *CLOSTRIDIUM* RŮZNÝMI KULTIVAČNÍMI A NON-KULTIVAČNÍMI TECHNIKAMI

Běžné metody pro identifikaci bakterií často spoléhají na běžné klinické výsledky, izolaci organismů, laboratorní identifikaci pomocí morfologických a biochemických (fenotypických) testů. Ačkoliv tyto metody jsou stále základní, je zde i výrazný posun k detekci anaerobních, především patogenních, bakterií v molekulární diagnostice nekultivačními metodami [24[68].

3.1 Kultivační metoda

Pro kultivaci a izolaci klostridií lze využít mimo jiné jejich odolnosti vůči teplotě. Materiál lze naočkovat do tekutých půd a zahřívat na teploty od 60 °C do 100 °C (tzv. frakcionované zahřívání). Vegetativní formy a nesporulující mikrobi uhynou, termorezistentní se podaří vykultivovat. Mohou se použít půdy s přidavkem neomycinu nebo gentamycinu [10].

Při zjišťování proteolytických klostridií musí médium obsahovat dostatečné množství sacharidu jako zdroje energie. Nejčastěji se používá bujón a zaočkované tekuté půdy se ve zkumavce převrstvují 2-10 mm vrstvou sterilního parafínu nebo 4 cm vrstvou 2% sterilního agaru (tzv. parafinová nebo agarová zátka. Inkubace probíhá 2-5 dnů při 30 °C. Růst se projeví vývinem plynu [29].

Mezofilní proteolytické druhy bakterií rodu *Clostridium* způsobují anaerobní kažení bílkovinných potravin a potravinářských surovin za vzniku toxických metabolitů hnilobného zápachu. (např. merkaptany, indol a skatol, biogenní aminy kadaverin a putrescin). Kromě toho produkují tyto bakterie také značné množství CO₂ a H₂, takže se jejich aktivita projevuje silným vývinem plynu. Protože činnost hnilobných bakterií je znemožněna kyselinou mléčnou, v potravinářství se nepříznivě uplatňují především sacharolytická klostridia, která mohou způsobit anaerobní kažení některých potravin s vysokým obsahem sacharidů, včetně polysacharidů [29].

Kvantitativní vyhodnocení mezofilních sporotvorných anaerobů je možné na miskách s agarovými půdami kultivovanými za přísně anaerobních podmínek. Je nutné, aby došlo také ke snížení tenze kyslíku v použité půdě, čehož lze dosáhnout přidavkem reduku-

jících látek (cysteinu, thioglykolátu, siřičitanu, pyrosiřičitanu, thiosulfátu a příp. jiných). Příkladem může být thioglykolátový agar nebo základy půd pro stanovení *Clostridium perfringens*. Anaerobní kultivace Petriho misek můžeme dosáhnout v exsikátoru nebo nádobě typu Nowyho zvonu, z nichž byl kyslík odstraněn některým fyzikálním nebo chemickým postupem [29].

Další možností, jak stanovovat klostridie v potravinách, je tzv. metoda nejpravděpodobnějšího počtu (MPN), jenž se řídí výpočtem vyprodukovaného množství plynu jednotlivými kmeny v anaerobním inkubátoru s laktózou jako zdrojem uhlíku a elektronů. Tato metoda vyžaduje test na čistotu získané kultury, která byla pozitivně hodnocena na přítomnost plynu pomocí plynové či kapalinové chromatografie na detekci těkavých a netěkavých mastných kyselin. Jelikož je tato technika zdlouhavá a nedostatečně spolehlivá, používají se dnes molekulární techniky, které jsou kultivačně bezlimitní a detekují vegetativní buňky přímo [15].

V diagnostice klostridií je užití diagnostických disků velmi důležité, protože ne všechna klostridia jsou velká a grampozitivní. Některá se barví gramnegativně – *C. ramosum* a mohou mít i fusiformní morfologii – *C. clostridiforme*. Také v diagnostice klostridií může pomoci lecitináza, lipáza, výše zmiňována ureáza, plazivý růst, lokalizace spor a indol. Většinou je ale zapotřebí identifikaci ověřit komerčním biochemickým setem, zvláště u klinicky významných izolátů [12].

3.2 Non-kultivační metody

Molekulární metody představují vhodný nástroj pro identifikaci patogenů, ke studiu vztahu hostitel-parazit a k objasnění zařazení jednotlivých patogenů. V posledních letech se objevuje vzrůstající trend k charakterizaci podle genotypů jednotlivých rodů. Genotypy jsou více specifické a daleko snadněji identifikovatelné než tradičně používané fenotypové markery [24].

3.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR (polymerázová řetězová reakce) je metoda sloužící pro detekci, identifikaci a stanovení bakterií (včetně anaerobů) v různých vzorcích. RT-PCR metoda (real-time PCR) úspěšně poskytuje rychlá kvantifikační data pro anaerobní druhy [24].

Metodu PCR objevil Kary Mullis v roce 1986. O několik let později mu byla udělena Nobelova cena za chemii a jevy související s PCR [2, [3]. Od 80. let minulého století, kdy poprvé byla tato metoda použita, poskytuje PCR mnoho molekulárně diagnostických možností a modifikací. V budoucnu se počítá s tím, že bude poskytovat nejen informace o jednotlivých anaerobních druzích, ale také o celých komunitách organismů [24].

PCR je metoda užívaná pro zmnožení (amplifikaci) částí DNA, které leží mezi dvěma úseky o známé sekvenci [3]. Díky exponenciální amplifikaci cílových sekvencí se jedná o metodu s vynikající citlivostí. Může být detekováno méně než 10 kopií DNA molekul [34].

Jedná se o třístupňový proces opakovaný v několika cyklech, který umožní vzniknout během několika hodin z pouhého jednoho piktoqramu až několik mikroqramů DNA složené z 10 000 nukleotidů [2]. Celý proces se provádí v tzv. termocykleru, který je schopen měnit teplotu reakčního prostředí velmi rychle (kolem 1 °C za 1 sekundu) a přitom velmi přesně. Nastavením specifických teplot denaturace, annealingu a extense se takto spustí jednotlivé fáze každého cyklu a jejich opakováním se spouští řetězová reakce. Termocykler několikrát opakuje stejný program (94 °C – 55-65 °C – 72 °C). Jeden cyklus trvá většinou méně než 3 minuty. Tímto způsobem lze za méně než dvě hodiny vytvořit miliardu kopií dané DNA sekvence [4].

Základní význam pro polymerázovou řetězovou reakci má Taq-DNA polymeráza, termostabilní enzym izolovaný z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech Yellowstonekého národního parku [17].

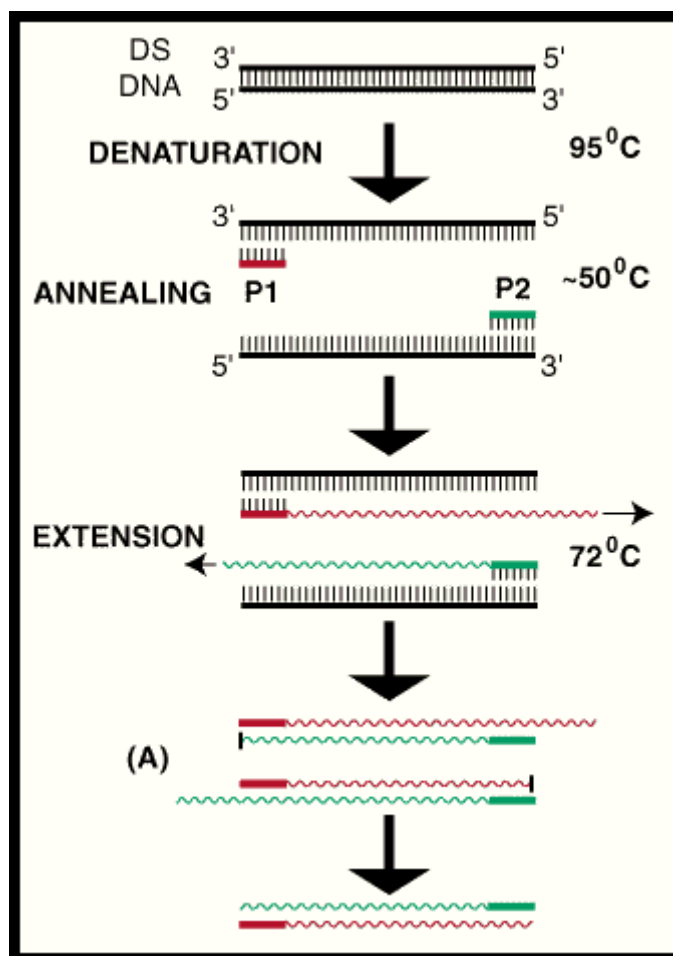
Průběh PCR reakce

Krok 1 Dvouvláknová výchozí DNA se zahřívá v přítomnosti Taq-polymerázy, Mg^{2+} iontů, čtyř monomerních deoxynukleotid-trifosfátů (dNTP) a přebytku dvou krátkých oligonukleotidových primerů o délce asi 20 bází. Každý primer je komplementární ke koncové sekvenci jednoho z cílových segmentů DNA. Při teplotě 95 °C dvouvláknová DNA denaturuje a obě vlákna se spontánně oddělí (Obr. 11) [2].

Krok 2 Snížení teploty na 37 – 65 °C umožní primerům, díky jejich vysoké koncentraci, aby se vodíkovými vazbami připoutaly ke svým komplementárním sekvencím na konci každého cílového vlákna (Obr. 11) [2]. Primery jsou krátké

jednovláknové úseky DNA, které mají schopnost najít ve vyšetřované DNA úsek, který jim chybí do dvouvláknové struktury a doplňuje je do tvaru dvojité šroubovice [3].

Krok 3 Teplota se opět zvýší na 72 °C a Taq-polymeráza katalyzuje připojení dalších nukleotidů k vláknům DNA, na nichž jsou přichyceny primery. Po ukončení replikace každého vlákna jsou hotovy dvě kopie původní DNA (Obrázek 11). Druhé opakování cyklu denaturace – připojení primeru, syntéza řetězce poskytne čtyři kopie DNA, třetí dá osm kopií, a tak dále v exponenciální řadě [2].



Obrázek 11: Průběh PCR reakce [51]

3.3 Aplikace PCR diagnostiky u anaerobních bakterií

Se vzrůstajícím se počtem genomů zařazených infekčních patogenů a využívání knihoven genů, které slouží jako základní amplifikační vzory pro tvorbu primerů, se mož-

nosti využití PCR rozvinuly a jeho různé variace PCR efektivně rozšiřují diagnostické schopnosti PCR. Zvyšují tak využití PCR v praxi [24], [59].

3.3.1 Broad-range PCR

Broad-range PCR je metoda založena na rozpoznání určitých genů, které jsou přítomny v různých organismech. Je vhodná pro široký okruh organismů. Navrhuje identifikaci patogenů a přímé možnosti použití PCR v klinické praxi. Používá k tomu 16S rRNA geny, které jsou přítomny ve všech organismech a obsahují jedinečné úseky charakteristické pro každou bakterii, ale stejně tak i oblasti, které se vyskytují ve všech známých bakteriích. Primery mohou být navrženy tak, aby rozpoznaly tyto chráněné sekvence. Toto sekvencování může být použito pro kultivované nebo nekultivované neznámé bakterie spojené s anaerobními infekcemi. Jedná se o velmi účinný nástroj pro identifikaci nových patogenů bakteriálního původu. V klinické praxi je každodenně žádaná pro charakterizaci izolovaných anaerobů. Je vysoce ceněna jako metoda při izolaci a identifikaci netypických klinických izolátů, které nemohou být rozpoznány podle běžných kritérií. Jako velmi účinná se také projevila u bakterií, které rostou pomaleji nebo jsou kultivačně náročné a u identifikace anaerobních bakterií. Tato metoda nepotřebuje žádné předběžné fylogenetické informace a je používána pro dříve necharakterizovatelné anaerobní patogeny nalezené například u abscesů mozku, chronických zánětů [24].

3.3.2 RT PCR (zpětná, reverzní PCR)

Jedná se o reverzní, nebo-li zpětnou PCR, kdy analýza genu probíhá na úrovni RNA. Tato modifikace má velký význam v základním lékařském, farmaceutickém a obecně biologicky orientovaném výzkumu. RT PCR využívá enzymatické reverzní transkripce RNA ke komplementární cDNA před vlastní amplifikací cDNA fragmentu polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) [24]. Výhodou této metody je její poměrná rychlost, snadnost provedení a nezávislost na použití radioaktivních látek [4]. Je to jeden z důležitých kroků v porozumění funkce genů a jejich aktivity [24].

3.3.3 Q-PCR (real-time PCR, kvantitativní PCR)

Významný pokrok a průlom v klinické a mikrobiologické praxi použití PCR technologie představuje real-time PCR. Tato modifikace nevyžaduje předchozí zesílené detek-

ce (například gelové elektroforézy) při získání poměrného množství DNA produktů současně s DNA syntézou [25]. Umožňuje přesnou kvantifikaci hledané cDNA sekvence ve vzorku [4]. Jeden ze základních rysů této technologie je schopnost zaznamenávat vzrůstající množství produktů v počátečních chvílích během samotné PCR reakce [34].

Nejčastěji jsou k detekci běžně používány čtyři odlišné principy [30]. Všechny jsou založeny na nárůstu fluorescence vlivem zvyšujícího se počtu nově syntetizovaných molekul DNA. Principiálně nejjednodušší a nejlevnější je metoda využívající fluorescenčních barviv, které se interkalují mezi báze DNA, narůstající fluorescence pak odpovídá vzrůstajícímu množství DNA ve vzorku [4], [30], [63]. Tato technologie je snadno aplikovatelná pro pevné stanovené PCR rozborů a nepotřebuje žádné dodatečné fluorescenční označování oligonukleotidů. Ostatní principy jsou postaveny na fluorescenčním značení oligonukleotidů [30].

V současnosti je nejvíce rozšířená metoda využívající 5-exonukleasové aktivity DNA polymerázy. Klíčovým je zde použití oligonukleotidu – próby, sondy (nejčastěji TaqMan sonda), která se specificky váže na sekvenci mezi oběma primery. Sonda je na jednom svém místě konci označená fluorescenční látkou a na druhé straně zhasičem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje DNA polymeráza TaqMan sondu, dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase. Na základě standardizačních křivek lze přesně kvantifikovat množství hledané cDNA sekvence ve vzorku [4].

Real-time PCR vyniká širokým rozměrem kvantifikace, vysokou technickou senzitivitou (více než 5 kopií) a vysokou přesností (méně než 2 % standardních chyb). Tato senzitivita je srovnatelná s jinými klasickými mikrobiologickými metodami, ale její předností je daleko méně intenzivní práce a menší časová náročnost. Další výhodou je, že nejsou požadovány žádné další post-PCR kroky. Tím je potlačena možnost cross-kontaminace PCR produktů, což má podstatný význam zejména pro diagnostické aplikace [30].

3.3.4 Long PCR

S narůstající popularitou PCR rostou požadavky na přesnou amplifikaci dlouhých fragmentů DNA (tzv. Long and Accurate). Taq polymeráza je schopna amplifikovat fragmenty genomové DNA do velikosti přibližně 3 kb. Neschopnost amplifikace delších fragmentů reflektuje skutečnost, že Taq DNA polymeráza nemá 3'-5' exonukleasovou aktivitu

a pokud dojde k chybné inkorporaci nukleotidu, může dojít až k ukončení amplifikace. Některé DNA polymerázy jako například Pfu, Deep Vent, Pwo mají 3'-5' exonukleasovou aktivitu, která snižuje výskyt chyb v průběhu amplifikace o řád. Jelikož tyto polymerázy mají nízkou účinnost a nejsou tedy použitelné pro amplifikaci dlouhých fragmentů [4]. LA DAN polymeráza mix obsahuje směs polymeráz a tím umožňuje amplifikovat relativně dlouhé DNA fragmenty [4].

3.3.5 RACE PCR (rapid amplification of cDNA)

RACE PCR, nebo-li rapid amplification of cDNA, je metoda rychlé amplifikace cDNA konců pomocí PCR. Nejprve se syntetizuje cDNA reverzní transkripcí z mRNA, kdy syntéza probíhá k 5' nebo 3' konci. Musí být známá část sekvence některého exonu. Amplifikace 5' konců vyžaduje purifikace prvotní cDNA a ukončení řetězce terminální transferázou za vzniku druhého poly(A) konce. Kombinací se pak získá celá plnohodnotná cDNA [4], [25].

3.3.6 Multiplex PCR

Významnou modifikací je multiplexová (mnohonásobná) PCR. Jedná se o velmi výkonnou metodu. V multiplexové PCR je použito více páru specifických primerů komplementárních k různým cílovým sekvencím v jedné amplifikační reakci a obvykle s detekcí značením ethidiumbromidem [4], [25]. Současná amplifikace několika cílů najednou se provádí s několika záměry. Buď mohou být sledovány změny v rozsáhlých oblastech DNA nebo sledují různé segmenty cílového genomu nebo může být zahrnuta vnitřní kontrola amplifikatelnosti vzorku. Dokonce mohou být vyvinuty cenové efektivní panely setu pro detekci více patogenů v jediném vzorku [4].

Nejsložitější je fáze přípravy, kdy se musí vypracovat reakční podmínky (sekvence nukleotidů, koncentrace primeru, optimální teplota jednotlivých cyklů) tak, aby amplifikační reakce pro každý testovaný úsek genomické DNA neprobíhala pouze v případech, že se jedná o mutaci v tom kterém příslušném místě. Pro každou reakci je zařazena pozitivní a negativní kontrola [4], [25].

3.3.7 Nested PCR

Zvýšení citlivosti metody v PCR se docílí pomocí hnízdového uspořádání (nested nebo seminested) [4]. Podstatou této modifikace PCR je nejprve amplifikace úseku, kde templátem je genomická DNA. Pak až následuje další PCR, tzv. „nested“ reakce, kde templátem je produkt předchozí reakce. Nested PCR tak využívá dvou párů primerů [25].

Typický postup hnízdové amplifikace zahrnuje první část (15-30 cyklů) s jedním párem primeru a druhou část (15-30 cyklů) s využitím druhého páru primeru, komplementárním k místům ve vnitřní sekvenci primárního amplikonu. Mezi oběma částmi se PCR produkt přenáší do nové zkumavky. Přenesením do nové zkumavky se vyřadí inhibitory, které mohou být ve vzorku přítomny. Byly popsány i postupy nested reakce bez otevřeného přenosu a pojmenovány jako „jednozkuškové“ na rozdíl od výše popsaných „dvouzkuškových“ [4]. Tato oblíbená modifikace má řadu aplikací a některé si vystačí se sadou pouhých tří primerů [25].

Nested PCR má nejen výhody, ale i určité nevýhody. Její citlivost je značně vysoká a často může být detekovaná jako jediná kopie cílové molekuly v reakční zkumavce bez použití hybridizace se značenou sondou. Amplifikace v druhé části provedení slouží zároveň k ověření specifiky produktu první části [4].

3.4 Metody založené na analýze fingerprintů

Klasifikace, identifikace a typizace anaerobních bakterií mají rozhodující význam v nemocniční epidemiologii, klinické mikrobiologii a mikrobiálních ekologických studiích. Objev PCR znamenal revoluci DNA fingerprintových metod. Univerzálnost a rychlost fingerprintových metod odvozených od PCR poskytují vhodný nástroj pro epidemiologii a taxonomii. Tyto techniky se mohou rozdělit do dvou kategorií, do rDNA-PCR-fingerprinting a PCR-fingerprinting založený na genomové DNA [24].

3.4.1 Fingerprintová analýza rDNA

PCR založenou na rDNA lze rozdělit do 4 kategorií:

1. **Amplifikovaná r-DNA restrikční analýza (ARDRA)** využívá univerzální primery k amplifikaci bakteriálních rDNA úseků s následným štěpením restrikčními endonukleasami (REA) udávající rozmanitost a zařazení bakteriálních izolátů do rodů a druhů.

ARDRA je metoda, která se rozsáhle používá k identifikaci důležitých anaerobních druhů, mimo jiné i klostridií [24].

2. **Terminální délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (T-RFLP)** je variantou ARDRA. Využívá jevu, že délka konečného restrikčního fragmentu amplifikovaného genu pro 16S rRNA je specifická pro různé fylogenetické skupiny mikroorganismů. Primer je označen fluorescenčním barvivem. Po restrikčním štěpení amplifikovaných 16S rRNA fragmentů může být označený terminální konec specificky detekován. Jeho velikost je následně určena pomocí elektroforézoy. Touto technikou můžeme stanovit nepatrné genetické rozdíly mezi řetězci. Stejně tak dobře tato technika poskytuje náhled do struktury a významu mikrobiálních komunit. Je vysoce senzitivní a především vhodná pro srovnávací analýzy. Používá se např. při rozboru bakteriální diversity smíšené humánní střevní mikroflóry [24].

3. **Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)** se používá k detekci non-RFLP polymorfismu [24]. Tato metoda umožňuje separaci DNA molekul v polyakryamidovém gelu na základě odlišné sekvence (liší se v jednom nukleotidu). Gel obsahuje lineární gradient formamidu a močoviny. Dvouvláknová DNA putuje rychlostí určenou její molekulovou hmotností až do doby, než vstoupí do té části gelu, kde je taková koncentrace denaturačních látek, že způsobí denaturaci dsDNA na jednovláknové molekuly. Tím nevýrazně změní její pohyblivost. Konečná pozice fragmentu DNA v gelu závisí tedy na denaturačním bodu (melting point). Fragменты identické velikosti mohou být takt separovány na základě odlišné sekvence v gelech s gradientem denaturačního činidla [25].

Používají se dva typy DGGE. Paralelní gely, ve kterých se zvyšuje koncentrace denaturačních činidel lineárně od shora dolů ve dvou samostatných paralelních gelech. Perpendikulární gely, ve kterých se zvyšuje koncentrace denaturačních činidel lineárně zleva doprava, tzn. napříč gelem. Detekce se provádí barvením stříbrem nebo ethidium-bromidem. Denaturačního gradientu lze docílit také gradientem teplotním (metoda TGGE) [25]. Používá univerzální primery k amplifikaci hypervariabilních oblastí 16S rDNA genů. Pak následuje DGGE k určení diversity smíšené flory. Tato metoda našla široké uplatnění především v ekologické analýze polymikrobiálních infekcí a v analýze lidské humánní mikroflóry. Také je vhodná pro detekci bakterií některých bakteriálních infekcí, které nemohou být identifikovány běžnou kultivací [24].

4. 16S-23S rRNA intergenová PCR polymorfni analýza. rRNA bakterií jsou jednovláknové molekuly 16S, 23S a 55S rRNA oddělené přešpanými mezerníky (spacers). Tyto mezerníky jsou vystaveny minimálnímu selekčnímu tlaku, proto by se měly lišit rozsáhleji než ostatní geny. Většina bakterií má zároveň tyto geny v několika kopiích různých délek, což zvyšuje možnosti použití této metody k taxonomickému zařazení bakterií. Modifikace této PCR amplifikace směřovala k tomu, aby byla tato metoda využita pro typizaci a identifikaci anaerobních bakterií [24].

3.4.2 Genomická PCR-based fingerprinting

PCR fingerprinting založený na analýze genomové DNA lze rozdělit na AP-PCR (RAPD) a rep-PCR. Obě metody se využívají v epidemiologii pro rozpoznávání infekcí, k detekci patogenů pocházejících z nemocničních prostředí, k rozpoznání zvláště virulentních kmenů organismů, apod. [24].

Metoda RAPD je založena na krátkých, náhodně se opakujících se úsecích, které hybridizují s chromozomální DNA za slabě stringentních podmínek. Počet a umístění míst pro nasednutí primerů se odlišuje podle různých kmenů bakteriálních druhů. Proto následující separace amplikonů gelovou agarozovou elektroforézou, která dává charakteristický výsledek (fingerprint) u jednotlivých bakteriálních kmenů [24].

rep-PCR slouží k amplifikaci specifických opakujících se úseků genomu různých bakterií. Tato PCR se uplatňuje hlavně k odlišení kmenů například *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium* spp. [24].

3.5 Výhody a nevýhody PCR

Hlavní výhodou PCR je její vysoká citlivost [26]. Metoda syntézy kopií DNA byla automatizována a během hodiny může být provedeno až 30 cyklů, což teoreticky odpovídá přípravě 2^{30} -násobku ($\sim 10^9$) původního vzorku. V praxi je ovšem efektivita každého cyklu nižší než 100 % a při 30 cyklech se získá kolem 10^6 - až 10^8 -násobku [2].

PCR funguje pouze v případě, že na templátová vlákna nasednou primery. Lze toho využít např. při detekci patogenních mikroorganismů v krvi člověka, neboť genetická informace těchto organismů se liší od lidské, takže je možné navrhnout primery, které budou fungovat pouze v případě, že se v krvi vyskytne DNA patogena [26].

PCR je zejména vhodná při detekci u organismů, u kterých není možná kultivace nebo je příliš zdlouhavá. PCR technika je rovněž využitelná v oblasti detekce a kvantifikace virových infekcí [26].

Každá reakce s testovaným vzorkem musí mít pozitivní a negativní kontrolu a interní kontrolu probíhající amplifikace, neboť největším problémem aplikace PCR technik je jejich „falešná“ pozitiva zapříčiněná vlastní citlivostí těchto technik. Teoreticky stačí jedna molekula DNA, která znečistí zkumavku se zkoumaným vzorkem a PCR ji zaregistruje jako falešně pozitivní signál [4], [25].

Mezi nejčastější zdroj kontaminace, která může zapříčinit narušení PCR analýzy, je například kontaminace reagensů používaných pro PCR v důsledku jejich opětovného používání. Jako kontaminanty mohou rovněž působit produkty PCR reakcí v laboratoři při opakovaných amplifikacích těchto cílových sekvencí nebo při výskytu poměrně velkého množství cílových DNA nebo RNA molekul přítomných ve vyšetřovaných vzorcích. Právě kontaminace prostřednictvím jednotlivých amplikonů je nejčastější chybou a příčinou kontaminace. Každá zkumavka používaná pro PCR reakci obsahuje kolem 10^{12} amplikonů, každá kapka aerosolu (6 -10 μ l) může obsahovat více než 10^5 cílových sekvencí. K eliminaci těchto nežádoucích „kontaminací“ jsou používány pre a post sterilizační postupy [4].

Další z preventivních opatření, jak zabránit kontaminaci, je založeno na využití dUTP místo dTTP v reakční směsi PCR. Bakteriální enzym uracil-N-glykosyláza degraduje DNA obsahující uracil. Jenom fragmenty DNA pocházející z PCR budou degradovány, protože normální DNA uracil neobsahuje. Uracil-N-glykosyláza je přidávána do reakční směsi před zahájením reakce, aby všechny případné amplikony byly včas degradovány. Samotný enzym je pak inaktivován při prvním denaturačním cyklu, takže nové produkty PCR se již mohou akumulovat v reakční směsi [25].

Jiná metoda je založena přidáváním psoralenu, do směsi na začátku reakce. Psoralen neinterferuje a je stabilní během teplotních cyklů. Zkumavky jsou ještě před ukončením reakce vystaveny UV světlu. Interakce mezi formami isopsoralenu a pyrimidinu neovlivňuje hybridizaci, ale zabraňuje následné amplifikaci DNA polymerázou. Další běžnou metodou je používání speciálních pipet a paketovacích špiček [25].

Pomocí metody enzymatické pre-PCR sterilizace je nežádoucí nukleotid (např. dTTP) ve všech amplifikačních reakčních směsích nahrazen dUTP (U nahrazuje T, U je inkorporován do amplikonu). Amplikony jsou díky „nepřirozeným“ nukleotidovým bázím rozpoznávány autentickými cílovými molekulami DNA. K této reakční směsi je pak přidáván bakteriální enzym uracil-N-glykolyasa (UNG), jehož fyziologická role spočívá v eliminaci uracilových reziduí vznikající při spontánní deaminaci cytosinu. Během krátké inkubace před vlastní amplifikací jsou řetězce DNA obsahující uracil enzymaticky degradovány. Tyto „roztrhané“ nežádoucí řetězce jsou pak substrátem pro další amplifikaci. Samotná UNG je pak teplotně inaktivována při 95 °C. Tato pre-PCR-sterilizace tedy eliminuje dříve vzniklé, nežádoucí amplikony a umožňuje amplifikaci „námi žádaných sekvencí“ [4].

Fotometrická-post-sterilizace využívá fotochemických vlastností psoralenu, derivátu 4-amino-ethyl-4,5-dimethyl-isopsoralu. Tato sloučenina je přidána do reakční směsi před vlastní amplifikací. Je termostabilní a neinterferuje s primery ani s Taq DNA polymerázou. Po vlastní amplifikaci, avšak ještě před otevřením zkumavky, je směs ozářena dlouhovlnným UV světlem, které fotochemicky aktivuje isopsoralaly, avšak nijak nepoškozuje DNA. Aktivované psorální sloučeniny vytvářejí na amplifikovaných úsecích DNA cyklobutanové sloučeniny obsahující pyrimidinové zbytky, které brání Taq DNA polymeráze v další amplifikaci. Efektivnost tohoto procesu je poměrně vysoká [4].

3.6 Analýza velikosti fragmentů

Po dokončení reakce je nezbytné detekovat amplikon. V některých amplifikacích je možné produkt detekovat přímo z reakční směsi. Způsob detekce závisí na konečné koncentraci produktu. Pro vizualizaci lze použít také různé sondy [40].

Existuje několik způsobů detekce PCR produktu po ukončení amplifikační reakce: [4]

- Elektroforetická detekce produktu PCR,
- Detekce pomocí barviv interagujících s DNA (ethidiumbromid),
- Radioaktivní značení přímo v PCR produktu nebo hybridizační sondě (radioaktivní izotopy),

- Neradioaktivní (neizotopové) značení digoxigeninem, biotinem (protilátky konjugované s enzymem), fluorescenčními barvivy a enzymy.

3.6.1 Radioaktivní a neradioaktivní (neizotopové) značení

Značení DNA se provádí metodami enzymatickými nebo přímou chemickou vazbou. V obou skupinách rozlišujeme značení radioaktivní a značení neizotopové. Enzymatické metody umožňují značení homogenní nebo značení pouze 3' nebo 5' konců [25].

Radioaktivní značení

K radioaktivní detekci se používají nukleotidy značené izotopy uvedenými v Tabulka 3. Tabulka 3: *Izotopy využívané ke značení molekul nukleových kyselin* [25].

Radioizotop	³² P	³⁵ S	³ H	¹⁴ C	¹³¹ I
Typ záření	β	β	β	β	β, γ
Poločas rozpadu	14,3 dnů	87,4 dnů	12,26 dnů	5730 dnů	8,04 dnů
β-energie (MeV)	1,709	0,167	0,019	0,156	0,806

Neradioaktivní (neizotopové) značení

Neizotopové enzymatické systémy značení dosahují stejné citlivosti jako radioaktivní a jsou vhodné pro automatizaci. Nejpoužívanější systém detekce jsou například biotin-protilátka-enzym-substrát, nebo biotin-streptavidin-enzym-substrát, digoxigenin-protilátka-enzym-substrát. Ve všech těchto systémech se používá některý z chromogenních, chemiluminiscenčních nebo fluorescenčních substrátů a enzym je konjugován s protilátkou nebo s avidinem. Používají se alkalická fosfatáza, peroxidáza, glukosidáza, β-galaktosidáza [25].

Velmi citlivý způsob detekce je bionylace nukleových kyselin a následná specifická reakce s modifikovaným avidinem. Bionylace se provádí arylazidovým derivátem biotinu s následnou fotoaktivací. Vzniká vysoce reaktivní skupina, která umožní kovalentní vazbu biotinu s nukleovou kyselinou. Hybridizace *in situ* vyžaduje někdy navíc inaktivaci endogenního biotinu [25].

Často jsou rovněž používány některé metody přímého značení založené na fyzikálních a chemických principech vazby s nukleovou kyselinou. Mezi tyto systémy patří značení ethidiumbromidem, radioaktivním jodem nebo barvení stříbrem. Možná je také kovalentní vazba enzymů na nukleovou kyselinu. Příkladem je zesílený chemiluminiscenční detekční systém. DNA, který se značí přímo peroxidázou působící za přítomnosti H_2O_2 na luminol. Zesílení signálu se provádí pomocí derivátů fenolu (například 4-jodofenol). Emitované světlo se detekuje na fotografickém filmu nebo se měří na luminometru [25].

Řada detekčních systému umožňuje různé sestavy a ve spojení s amplifikační reakcí jsou pak tyto metody vhodné pro automatizaci [25].

3.6.2 Agarosová gelová elektroforéza

Produkty restrikčních a amplifikačních reakcí (fragменты DNA) se dělí podle své relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje elektroforézou DNA fragmentů v gelu [25].

Sacharido-fosfátová páteř nukleových kyselin je příčinou rovnoměrného rozložení negativních nábojů v molekulách DNA a RNA. Pohyb těchto vysoce elektronegativních molekul v elektrickém poli vede k jejich separaci podle molekulové hmotnosti. Větší dělicí mohutnosti pro rozdělení velkých fragmentů (až 5000 kb) lze docílit použitím elektroforézy v pulzujícím poli (PFGE). Právě analýza velikosti fragmentů je podstatou interpretace řady molekulárně biologických metod. Nejčastěji se používá jako elektroforetické medium agarosa (0,8-3,0 %), jejíž koncentrace se volí podle velikosti fragmentů, které mají být separovány (Tabulka 4) [25].

Tabulka 4: *Závislost koncentrace agarosového gelu na velikosti dělených fragmentů* [25].

VELIKOSTI FRAGMENTŮ	KONCENTRACE AGAROSY
1 -20 kbp	0,4 – 0,8 %
500 – 1000 bp	2 %
100 -500 bp	3 %
10 – 100 bp	5 %

Mnoho aplikací požívá horizontální elektroforézu, kdy je gel uložen ve vaně a ponořen do pufru (TE, TBE, TAE). Nejběžnější aplikace používají dvě velikosti gelů, například 12 x 20 cm nebo 5 x 9 cm. Nanášení vzorku (0,1 – 0,5 mg DNA) na start do jamek předchází smíšením s nanášecím pufrem, obvykle v poměru 1:4 nebo 1:5, který obsahuje barvu viditelného spektra (například bromfenolovou modř) [25].

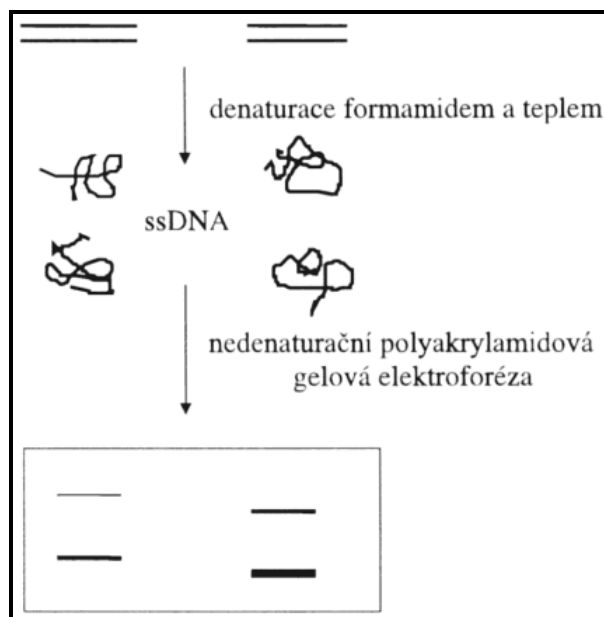
Rozdělené frakce je možné buď tzv. blotováním přenést na speciální membrány a podrobit hybridizaci nebo pomocí fluorescenčních barviv, například ethidiumbromidu, interkalací mezi nukleotidy (50 mg/100 ml gelu), podrobit vizualizaci na transiluminátoru v UV světle s následnou fotodokumentací. Ethidiumbromid je interkalační barvivo s mutagenními účinky, proto při s ním se musí používat rukavice. Jako kalibrační škály molekulové hmotnosti (velikosti fragmentů) se používají DNA markery [25].

3.6.3 Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Druhým nejčastěji používaným elektroforetickým médiem v molekulární biologii je polyakrylamidový gel. V tomto případě se jedná o vertikální elektroforézu. Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje při pokojové teplotě v pufru (TAE) pomocí volných radikálů poskytovaných persulfátem amonným (APS), který způsobuje hemolytické štěpení vazeb O-O. K urychlení polymerizace se používá volná zásada TEMED (tetrametylendiamin), který katalyzuje tvorbu volných radikálů persulfátu amonného. Jiným užívaným iniciátorem polymerizace je riboflavin, který je účinný již při velmi nízkém pH nebo za přítomnosti O_2 . Konečné koncentrace TEMEDu a APS v polymerizačním roztoku by měly být 0,05 %. Použitá koncentrace akrylamidu se liší podle velikosti separovaných fragmentů DNA od 3,5 % (fragменты 1-2 kbp) až po 20 % gely pro separaci malých fragmentů 10 - 100 bp [25].

3.6.4 Analýza jednovláknového konfirmačního polymorfismu (SSCP)

Metoda analýzy jednovláknového konfirmačního polymorfismu (SSCP nebo SSCA) je jednoduchou, velice senzitivní a efektivní technikou k detekci mutací typu změny jedné báze [25].

Obr. 1: *Princip SSCP* [47]

Metoda je založena na principu různé migrace jednovláknových molekul DNA, které se liší svou sekundární strukturou (konformací) v nativním (nedenaturačním) polyakrylamidovém gelu. Unikátní konformace jednovláknového fragmentu DNA je dána intramolekulárními interakcemi uvnitř DNA sekvence (Obr. 1). Tato konformace je závislá na teplotě a iontové síle. Teplota při elektroforéze je klíčovým parametrem, který ovlivňuje kvalitu rozlišení DNA proužků. Již tak malý rozdíl, jako je záměna jedné báze, způsobí změnu konformace a rozdílnou pohyblivost při elektroforéze za dodržení nedenaturačních podmínek. Rozdíl v konformaci může být způsoben odlišností pouze jedné báze v sekvenci DNA. Tato vysoce citlivá technika zachycuje až 100% mutací v DNA fragmentech menších než 200 bází a 80% mutací v DNA fragmentech menších než 400 bází. Optimální velikost PCR produktu pro detekci mutací je 150 bází, větší PCR produkty jsou vhodné ke sledování polymorfismů [25].

3.6.5 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je alternativní metodou separace fragmentů DNA, která má několik výhod. Především minimální spotřebu vzorku (1-2 nl o koncentraci 5-50 mg/l), rychlost a snadnou vizualizaci. Separace probíhá v lineárním hydrofilním polymeru v kapiláře (vnitřní průměr 25-50 μm, délka několik cm až 1 m) a elektroforetickém pufru podle molekulové hmotnosti. Elektroendoosmóza se využívá k zavedení vzorku a dále je eliminována použitím kapilár se speciální úpravou vnitřního povrchu. K zařízení je připo-

jena přímá detekce měřením absorbance při 260 nm. Typická analýza trvá přibližně 30 minut. Po separaci jednovláknové DNA se používá pufr obsahující ureu. Systém umožňuje jednoduché změny ve složení pufru [25].

Tabulka 5: *Porovnání vybraných metod vhodných pro detekci neznámé mutace* [25]

Metoda	Velikost produktu	Senzitivita metody	Lokalizace mutace
SSCP	250 bp	80%	ne
DGGE	600 bp	95%	ne
CMC	1700 bp	> 95%	ano
Přímé sekvencování	500 bp	> 99%	ano
Heteroduplexy	300 bp	80%	ne

text

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce byla detekce bakterií rodu *Clostridium* kultivačními a nekultivačními metodami.

Bakterie rodu *Clostridium* jsou běžnou součástí lidské mikroflóry a jejich výskyt je rozsáhlý. Některé mohou být příčinou mnoha alimentárních onemocnění pocházejících z potravin nebo mohou být příčinou několika vad při výrobě potravin.

K zjištění jejich přítomnosti v potravinách či jiných materiálech se využívá řada biologických metod, jak klasických kultivačních, tak i modernějších molekulárně diagnostických metod jako je například polymerázová řetězová reakce (PCR) s detekcí pomocí agarosové gelové elektroforézy s následnou vizualizací UV transiluminátorem.

Kultivační metodou byla zhodnocena morfologie kolonií a schopnost růstu na různých druzích půd s cílem vyizolovat čistou kulturu pro následnou polymerázovou řetězovou reakci.

Předmětem použití PCR bylo ověřit, že tato metoda je vhodná pro detekci přítomné DNA ve vzorcích. Také proběhla optimalizace PCR reakce za účelem získat optimální teplotu pro amplifikaci.

Za tímto účelem bylo vybráno těchto 10 kmenů: *Clostridium histolyticum* CAPM 5943, *Clostridium novyi* CAPM 5949, *Clostridium perfringens* CAPM 5744 a CAPM 5872, *Clostridium septicum* CAPM 5743, *Clostridium sporogenes* CAPM 6329, *Clostridium butyricum* CAPM 6342, *Clostridium difficile* CAPM 6244, *Clostridium ramosum* CAPM 6343, *Clostridium intestinale* CAPM 6397.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Chemikálie

- Agar (HiMedia)
- Agarosa pro elektroforézu (SERVA)
- Ethidiumbromid (SERVA)
- 20 % dodecylsulfát sodný (SDS) (SERVA)
- Fyziologický roztok
- Lysozym (koncentrace 50 mg/ml) (SERVA)
- Proteináza K (koncentrace 1mg/ml) (SERVA)
- Fenol (Sigma-Aldrich)
- Chloroform (Lach-Ner)
- 3 M octan sodný (Lach-Ner)
- Etanol (Lach-Ner)
- DNA marker (New England Biolabs)

Všechny používané chemikálie byly v čistotě p.a.

5.2 Komponenty pro PCR

- DNA primery P930 a P932 (KRD)
- dNTP směs (SERVA)
- reakční pufr s Mg^{2+} ionty pro Taq polymerázu (10 x koncentrovaný, New England Biolabs)
- Taq DNA polymeráza (New England Biolabs)

5.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (Kern)
- Minicentrifuga (BioSan)

- Fotoaparát (Canon)
- Thermocykler (PTC Research)
- Automatické mikropipety (Biohit, Nichyrio, Hirschmann)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL)
- Zdroj elektrického proudu pro elektroforézu (Bio-Rad)
- Transiluminátor (ULTRA LUM)
- Autokláv (Varioklav)
- Biohazard Box (Euro Flow)
- Vortex (Heildorph)
- Centrifuga (Hermle)
- Petriho misky
- Běžné laboratorní sklo
- Umělohmotný laboratorní materiál a pomůcky

5.4 Kultury bakterií

K experimentům byly použity kmeny bakterií rodu *Clostridium*, které byly získány ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů při Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně. Každý kmen byl po jedné ampuli. Kmeny byly uchovávány na příslušných půdách na Petriho miskách v ledničce. Optimální teplota růstu těchto kmenů je přibližně 35 ± 2 °C.

Seznam použitých kmenů:

- *Clostridium histolyticum* CAPM 5943
- *Clostridium novyi* CAPM 5949
- *Clostridium perfringens* CAPM 5744
- *Clostridium perfringens* CAPM 5872
- *Clostridium septicum* CAPM 5743
- *Clostridium sporogenes* CAPM 6329

- *Clostridium butyricum* CAPM 6342
- *Clostridium difficile* CAPM 6244
- *Clostridium ramosum* CAPM 6343
- *Clostridium intestinale* CAPM 6397

5.5 Kultivační média a roztoky

5.5.1 Kultivační média

Během praktické části práce byly testované kmeny kultivovány na příslušných půdách pro anarobní bakterie.

- **Anaerobic Agar (AA)**

Látka:	gram/litr
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	20
Chlorid sodný	5
Dextrosa	10
Thioglykan sodný	2
Hydroxymethansulfínan sodný	1
Methylenová modř	0,002
Agar	20

Příprava půdy: Bylo naváženo 14,5 g AA půdy a rozpuštěno v 250 ml vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut. Takto připravená půda byla rozlita na Petriho misky.

- **Perfringens Base Agar (PBA)**

Látka:	gram/litr
Tryptosa	15
Sojový pepton	5
Hovězí extrakt	5

Kvasničný extrakt	5
Pyrosiřičitan sodný	1
Citran železito-amonný	1
Agar	15

Příprava půdy: Bylo naváženo 11,75 g PA půdy a rozpuštěno v 250 ml vody. Sterilace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut. Takto připravená půda byla rozlita na Petriho misky.

- **Fluid Thioglycollate Agar (FTA)**

Látka:	gram/litr
Enzymatický hydrolát kaseinu	15
Kvasničný extrakt	5
Dextrosa	5,5
Chlorid sodný	2,5
L-lysin	0,5
Thioglykan sodný	0,5
Resazurin	0,001
Agar	0,75

Příprava půdy: Příslušné množství půdy bylo rozpuštěno v destilované vodě. Sterilace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut. Takto připravená půda byla rozlita na Petriho misky.

- **Reinforced Clostridial Agar (RCA)**

Látka:	gram/litr
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	10
Hovězí extrakt	10
Kvasničný extrakt	3

Dextrosa	5
Chlorid sodný	5
Octan sodný	3
Škrob	1
L-cystein	0,5
Agar	0,5

Příprava půdy: Příslušné množství půdy bylo rozpuštěno v destilované vodě. Sterilace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut. Takto připravená půda byla rozlita na Petriho misky.

- **Wilkins Chalgran Anaerobic Agar (WChAA)**

Látka:	gram/litr
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	10
Masový pepton	10
Kvasničný extrakt	5
Dextrosa	1
Chlorid sodný	5
L-arginin	1
Pyrohroznán sodný	1
Hemin	0,005
Menadion	0,005
Agar	10

Příprava půdy: Bylo naváženo 10,7 g WChAA půdy a rozpuštěno v 250 ml vody. Sterilace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut. Takto připravená půda byla rozlita na Petriho misky.

5.5.1.1 Roztoky pro izolaci DNA a gelovou elektroforézu

- **TBE pufr**

Tris HCl	54 g
Kyselina boritá	27 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 ml

- **CIZ**

Směs chloroform : isoamylalkohol v poměru 24:1

- **TE pufr**

10mM Tris-HCl (pH 7,8)

1 mM EDTA (pH 8,0)

5.6 Metody

5.6.1 Kultivace bakteriálních buněk

- 1) Z tekutého bujónu byly v boxu asepticky vyočkovány bakteriální kmeny *Clostridium histolyticum* CAPM 5943, *Clostridium novyi* CAPM 5949, *Clostridium perfringens* CAPM 5744 a CAPM 5872, *Clostridium septicum* CAPM 5743, *Clostridium sporogenes* CAPM 6329, *Clostridium butyricum* CAPM 6342, *Clostridium difficile* CAPM 6244, *Clostridium ramosum* CAPM 6343, *Clostridium intestinale* CAPM 6397 na jednotlivé půdy křížovým roztěrem a dány na kultivaci v anaerostatu při 30 °C
- 2) Za 7 dní byly narostlé buňky opět přeočkovány křížovým roztěrem na misky s jednotlivými kultivačními půdami.
- 3) Za týden byl zkontrolován vzhled kolonií a vlastní izolace buněk.

5.6.2 Izolace DNA metodou lyze v lyzačním pufru

- 1) Z kultury narostlé na Petriho misce byla odebrána bakteriální kličkou kolonie buněk a vše bylo důkladně rozmícháno v eppendorfkové mikrozkuhavce se 100 µl sterilní destilované vody a vařeno 30 minut při 100 °C.

- 2) Pelet byl resuspendován v 500 μ l lyzačního roztoku se sacharózou. Následně bylo přidáno 10 μ l čerstvě připraveného lysozymu (koncentrace 50 mg/ml). Inkubace byla při teplotě 37 °C prodloužena přes noc.
- 3) Poté bylo přidáno 100 μ l 20% SDS, promícháno a inkubováno při teplotě 55 °C po dobu 30 minut.
- 4) Bylo přidáno 5 μ l proteinázy K (koncentrace 1mg/ml), promícháno a inkubováno při teplotě 55 °C 1 hodinu.
- 5) Byl přidán stejný objem fenolu a vše bylo promícháno 4 minuty plynulým kývavým pohybem a zcentrifugováno 5 minut při 3500 ot./min. Horní fáze s DNA byla opatrně odebrána do čisté zkumavky. Nesmí být odebrána proteinová mezivrstva.
- 6) Následně byl přidán stejný objem směsi fenol-chloroform, promícháno 4 minuty plynulým kývavým pohybem a zcentrifugováno 5 minut při 3500 ot./minut. Horní vrstva fáze s DNA byla opatrně odebrána do čisté zkumavky. Nesmí být opět odebrána proteinová mezivrstva.
- 7) Byl přidán stejný objem CIZ a směs byla promíchána 4 minuty plynulým kývavým pohybem a zcentrifugována 5 minut 3500 ot./minut. Horní vrstva fáze s DNA byla opatrně odebrána do čisté zkumavky. Opět nesmí dojít k odebrání proteinové mezivrstvy.
- 8) Horní vrstva s DNA byla odebrána do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 2,5 násobek objemu na -20 °C vychlazeného 96 % etanolu. Následně byla provedena inkubace přes noc při -20 °C.
- 9) Byla provedena centrifugace při 10 000 ot./min po dobu 30 minut při 4 °C.
- 10) Byl odstraněn supernatant. DNA byla vysušena a rozpuštěna v 50 – 100 μ l TE pufru. DNA je možné krátkodobě skladovat při teplotě 4 °C. Dlouhodobě pak je vhodné uchovávat při -20 °C.

5.6.3 Polymerázová řetězová reakce

PCR směs byla připravována ve 200 μ l eppendorfkových mikrozkušavkách. V rámci diplomové práce byly testovány rovněž různé komponenty pro přípravu PCR směsi. Z tohoto důvodu byly připravovány 2 směsi o různém složení. V obou případech byly jed-

notlivé komponenty do mikrozkušavek pipetovány zvlášť. U vzorků, kde se složení PCR směsi nelišilo, byl zvolen postup namíchání tzv. master mixů. Master mix byl připraven smícháním příslušného objemu všech komponent s výjimkou DNA matrice. Po dokonalém promíchání byla směs krátce centrifugována a následně rozpipetována do jednotlivých mikrozkušavek. Teprve podom byla přidána templátová DNA.

Jednotlivé komponenty byly ve směsi I postupně přidávány v následujícím pořadí:

1. deionizovaná sterilní H₂O
2. reakční Taq pufr (10x koncentrovaný)
3. dNTP směs (10mM)
4. DNA primer I (P930; 0,5 μM)
5. DNA primer II (P932; 0,5 μM)
6. DNA matrice
7. DNA polymeráza (5U/μl)

Složení směsi II bylo následující:

1. deionizovaná sterilní H₂O
2. Fast Start Master Mix (Roche)
3. DNA primer I (P930; 0,5 μM)
4. DNA primer II (P932; 0,5 μM)
5. DNA matrice

Pokud byla PCR směs míchána z jednotlivých složek, tak po každé přidané složce PCR směsi bylo vše důkladně promícháno. Na konec se směs nechala důkladně stočit na krátkou dobu na centrifuze. Následně byla vložena do termocykleru s předem nastaveným programem, který je uveden v následující kapitole.

Pro zajištění úplné denaturace DNA matrice a také rovněž z důvodů inaktivace kontaminujících proteáz a pro zvýšené citlivosti reakce se doporučuje tzv. „horký start“ – zahřátí vzorku na 95 °C po dobu 10 minut.

Pro detekci mikroorganismů byly použity primery P930 (primer I) a P932 (primer II), pomocí nichž lze amplifikovat část genu pro 16S rRNA pro potravinářsky významná

klostridia. S použitím výše zmíněných primerů získáme PCR amplikon o velikosti 665 bp. Oba primery byly připraveny tak, že byly vyředěny v deionizované vodě na konečnou koncentraci 0,5 μ M.

Při provádění PCR je nutno zařadit kontrolu čistoty vzorku. Jako negativní kontrola byl použit vzorek, který obsahoval všechny komponenty reakce bez DNA. Místo DNA matrice bylo použito stejné množství sterilní destilované vody. Tím jsme si ověřili, že nedošlo ke kontaminaci žádné ze složek PCR reakce.

5.6.3.1 Vlastní provedení PCR reakce

Vzorky po jemném, ale důkladném promíchání na centrifuze byly umístěny do termocykleru, který byl následně spuštěn dle předem nastaveného programu:

Denaturace (tzv. hot start) – 95 °C/15 min

Poté následovalo 35 cyklů:

1. krok denaturace 94 °C/30 s

2. krok připojení primerů 58 °C/30 s

3. krok syntéza řetězce DNA 72 °C/1 min

Po proběhnutí 35 reakčních cyklů byla naprogramována ještě závěrečná extenze při teplotě 72 °C po dobu 5 min.

Po skončení reakce byly produkty PCR detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Optimalizace PCR amplifikace

Pro optimalizaci amplifikace PCR byl použit teplotní gradient v rozmezí teplot od 55 °C do 61 °C a použit lyzát buněk DNA z druhu *Clostridium butyricum* CAPM 6342. Dále bylo provedeno ředění jak DNA čisté kultury, tak i následně získaného lyzátu (purifikovaná DNA) a dvou rozdílných programů PCR.

Amplifikace byla vedena dle programu s tím, že byl použit gradient teplot v rozmezí 55 – 61 °C. V jednotlivých pozicích cykleru byly testovány následující teploty:

61 °C,
60,1 °C, 59,5 °C, 58,6 °C, 57,6 °C, 56,7 °C, 56 °C a 55 °C.

5.6.4 Agarosová gelová elektroforéza

PCR produkty (amplikony PCR) byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy s použitím vhodného standardu, tzv. DNA markeru s fragmenty DNA známé délky. Při použití dvojice primerů P930 a P932 se očekával DNA produkt o velikosti 665 bp, který byl detekován v 1,5 % agarosovém gelu.

Příprava agarosového gelu

Příslušné množství agarosy (3 g) bylo smícháno se 200 ml 0,5 TBE pufru. Směs byla opatrně s opakovaným rozmícháním rozvařena v mikrovlnné troubě. Poté se nechal roztok ochladit a bylo přidáno 4 µl ethidiumbromidu. Takto připraven roztok byl nalit do elektroforetické vaničky s hřebínky tak, aby nevznikly žádné vzduchové bubliny. Případné vzniklé bubliny byly odstraněny špičkou. Pak se vše nechalo ztuhnout ve vodorovné poloze při pokojové teplotě po dobu asi 30 minut. Po utužení agarosy byl gel opatrně zalit 0,5 x TBE pufrem asi do výšky 2-3 cm nad agarosový gel. Celé práce probíhala v rukavicích, neboť ethidiumbromid je mutagenní látka.

Nanášení vzorku na gel

Množství amplifikované směsi o objemu 15 µl bylo smícháno s 3 µl nanášecího pufru a pomocí mikropipet bylo nanášeno do komůrek v gelu ve směru zleva doprava. Do první komůrky byl nanášen standard a do poslední vzorek negativní kontroly.

Průběh elektroforézy a vizualizace DNA fragmentů

Elektroforéza byla spuštěna při napětí 80-90 V. Separace se provádí tak dlouho, dokud bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufre nedoputuje do 2/3 délky agarosového gelu.

Obarvený gel byl prohlížen na transiluminátoru a pro dokumentaci vyfotografován digitálním fotoaparátem.

Stanovení velikosti specifického fragmentů DNA

Jako standard o definovaném počtu bází byl při elektroforéze multiplikovaného DNA fragmentu použit komerčně dostupný 100 bp DNA marker, který obsahoval DNA fragmenty o velikosti: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1517 bp.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 Kultivace bakteriálních buněk

Pro kultivaci bakterií rodu *Clostridium* (*Clostridium histolyticum* CAPM 5943, *Clostridium novyi* CAPM 5949, *Clostridium perfringens* CAPM 5744, *Clostridium perfringens* CAPM 5872, *Clostridium septicum* CAPM 5743, *Clostridium sporogenes* CAPM 6329, *Clostridium butyricum* CAPM 6342, *Clostridium difficile* CAPM 6244, *Clostridium ramosum* CAPM 6343, *Clostridium intestinale* CAPM 6397) bylo zvoleno 5 různých půd pro anaerobní bakterie s tím, že se na všech použitých půdách porovnávaly jednotlivé morfologické znaky:

- velikost,
- barva,
- okraje,
- tvar,
- profil,
- konzistence narostlé kolonie [19].

Všechny testované kmeny byly kultivovány na jednotlivých půdách v anaerostatu při teplotě 37 °C po dobu 7 dní. Bylo použito těchto 5 médií:

- Anaerobic Agar,
- Perfringens Base Agar,
- Fluid Thioglycolate Agar,
- Reinforced Clostridial Agar,
- Wilkins Chalgran Anaerobic Agar.

Jednotlivé morfologické znaky jsou shrnuty do Tabulka 6-Tabulka 15.

Kolonie jednotlivých kmenů, které vyrostly na médiu Anaerobic Agar byly bílé až světle béžové barvy, dobře rozlišitelné. Barva této půdy byla ovlivněna přítomným barvivem - methylenovou modří, které je indikátorem anaerobiózy, kdy případně vzniklá modrá barva indikuje přítomný kyslík.

Na půdě Perfringens Base Agar vyrostly kolonie jednotlivých kmenů v mléčné (*C. perfringens*), béžové (*C. histoliticum*) a bílé barvě (*C. sporogenes*). Zbarvení půdy u většiny narostlých kolonií ovlivňuje jejich výslednou barvu. U *C. perfringens* měla kolonie na knoflíkovitém profilu výrazný černý terčík, což je způsobeno obsahem citranu železitoamonného v půdě, který slouží jako indikátor produkce H₂S (sulfan). Ze sirovodíku se pak tvoří černý sulfan železitý, který indikuje přítomnou bakterií černým zbarvením. Všeobecně tvorba sirovodíku patří mezi důležitý identifikační znak pro průkaz přítomných bakterií.

Na půdě Fluid Thioglycolate Agar byl nárůst kolonií bakterií poměrně slabý. Jednotlivé kolonie byly neprůsvitné a zbarveny světle žlutě až do světle hněda.

Na půdě Reinforced Clostridial Agar vyrostly velmi drobné kolonie a nárůst nebyl celkově dobrý. Kolonie byly bílé (*C. butyricum*, *C. intestinale*) a béžové (*C. difficile*, *C. novyi*). Konzistence nárůstu byla měkká, pastovitá.

Na půdě Wilkins-Chalgren Anaerobic Agar byly kolonie dobře narostlé, hladké a nebyly ovlivněny barvou půdy. Měly měkkou konzistenci.

Tabulka 6: Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Anaerobic Agar

Kmen	Velikost	Barva	Okraje	Tvar	Profil	Konzistence
<i>Clostridium histolyticum</i> , CAPM 5943	do 2 mm	běžová, neprůsvitná	hladké	okrouhlý	mírně zvýšený	pastovitá
<i>Clostridium novyi</i> , CAPM 5949	1 - 2 mm	bílá, lehce zbarvená barvou půdy, neprůsvitná	hladké, mírně vroubkované	okrouhlý	ploché až mírně zvýšený	měkká, hladká
<i>Clostridium perfringens</i> , CAPM 5744	1 - 2 mm	bílá, neprůsvitná	hladké	okrouhlý	zvýšený	pastovitá
<i>Clostridium perfringens</i> , CAPM 5872	do 1 mm	bílá, neprůsvitná	hladké	okrouhlý	mírně vypouklý	tuhá
<i>Clostridium septicum</i> , CAPM 5743	do 1 mm	bílá, neprůsvitná	hladké	okrouhlý	knoflíkovitý	hladká, neprůsvitná

Tabulka 7: Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Anaerobic Agar

Kmen	Velikost	Barva	Okraje	Tvar	Profil	Konzistence
<i>Clostridium sporogenes</i> , CAPM 6329	do 2 mm	běžová, neprůsvitná	hladké	okrouhlý	zvýšený s mírně vypouklým středem	hladká, až jemně granulovitá
<i>Clostridium butyricum</i> , CAPM 6342	1 - 2 mm	bílá, neprůsvitná	hladké	okrouhlý	vypouklý	tuhá, neprůsvitná
<i>Clostridium difficile</i> , CAPM 6244	do 2 mm	bílá s nádechem barvy půdy,	hladké	okrouhlý	ploché	tuhá, vlhká
<i>Clostridium ramosum</i> , CAPM 6343	1 - 3 mm	bílá, neprůsvitná	mírně vroubkované	mírně zvlňený	zvýšený	pastovitá, jemně granulovitá
<i>Clostridium intestinale</i> , CAPM 6397	1 - 2 mm	světle béžová, ovlivněna barvou půdy	hladké	okrouhlý	vypouklý	tuhá, lesklá

Tabulka 8: Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě *Perfringens Base Agar*

Kmen	Velikost	Barva	Okraje	Tvar	Profil	Konzistence
<i>Clostridium histolyticum</i> , CAPM 5943	2 mm	běžová, lesklá, neprůsvitná	zvraštělé	okrouhlý	vypouklý	kašovitá až polotuhá
<i>Clostridium novyi</i> , CAPM 5949	až 8 mm	průsvitná v odstínu půdy	zvraštělé	sektorový	knoflíkovitý s výrazným středem	kožovitá
<i>Clostridium perfringens</i> , CAPM 5744	do 13 mm	mléčná lesklá	zvraštělé	sektorový	knoflíkovitý s výrazným černým terčíkem	mazlavě slizovitá
<i>Clostridium perfringens</i> , CAPM 5872	až 15 mm	průsvitná, lesklá, v barvě půdy	zvraštělé	sektorový	plochý	tuhá
<i>Clostridium septicum</i> , CAPM 5743	až 13 m	průhledná, matná	zvraštělé až rhizoidní	sektorový	plochý	tuhá
<i>Clostridium sporogenes</i> , CAPM 6329	2 – 6 mm	průsvitná až bílá	zvraštělé	zvlněný	knoflíkovitý	slizovitá

Tabulka 9: Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě *Perfringens Base Agar*

Kmen	Velikost	Barva	Okraje	Tvar	Profil	Konzistence
<i>Clostridium butyricum</i> , CAPM 6342	1 - 3 mm	průsvitná, béžová	zvráštělé	sektorový	plochý	tuhá
<i>Clostridium difficile</i> , CAPM 6244	až 1 mm	průsvitná, lesklá, v barvě půdy	zvráštělé	sektorový	knoflíkovitý s zvýrazným středem	kožovitá
<i>Clostridium ramosum</i> , CAPM 6343	3 mm	průsvitná, bílá	vroubkované	sektorový	plochý	tuhá
<i>Clostridium intestinale</i> , CAPM 6397	18 mm	mléčná až béžová, průsvitná	s koncentrickou stavbou	okrouhlý	knoflíkovitý	mazlavá

Tabulka 10: *Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Fluid Thioglycollate Agar*

Kmen	Velikost	Barva	Okraje	Tvar	Profil	Konzistence
<i>Clostridium histolyticum</i> , CAPM 5943	1 - 2 mm	světlé hnědá, neprůsvitná	okrouhlý až lehce zvlněný	zubaté	vypouklý	pastovitá
<i>Clostridium novyi</i> , CAPM 5949	1 – 10 mm	mléčná až světlé béžová, neprůsvitná	sektorový	rhizoidní	knoflíkovitý, vypouklý střed	hladká, jemně granulovitá
<i>Clostridium perfringens</i> , CAPM 5744	3 - 6 mm	béžový až světle hnědý, neprůsvitná	sektorový	zvraštělý	ploché až mírně zvýšený	pastovitý až jemně granu- lovitý
<i>Clostridium perfringens</i> , CAPM 5872	1 -9 mm	béžová, ne- průsvitná	sektorový	vroubkovaná až zvraštělá	ploché	granulovitá, vlhká
<i>Clostridium septicum</i> , CAPM 5743	2 - 4 mm	světle béžová	zvlněný	vroubkovaná až zvraštělá	ploché	hladká
<i>Clostridium sporogenes</i> , CAPM 6329	1 -15 mm	světle hnědá, ovlivněno barvou půdy, neprůsvitná	sektorový	zvraštělá	zvýšený až mírně vy- pouklý	jemně granu- lovitá

Tabulka 11: *Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Fluid Thioglycollate Agar*

Kmen	Velikost	Barva	Okraje	Tvar	Profil	Konzistence
<i>Clostridium butyricum</i> , CAPM 6342	5 - 6 mm	bílá, neprůsvitná	sektorový	rhizoidní	zvýšený až vypouklý	hladká, tuhá
<i>Clostridium difficile</i> , CAPM 6244	1 - 10 mm	běžová až světle hnědá, neprůsvitná	sektorový	rhizoidní až světle hnědá	vypouklý s zvýrazněným středem	jemně granulovitá, neprůsvitná
<i>Clostridium ramosum</i> , CAPM 6343	1 - 4 mm	bílá, neprůsvitná	zvlněný	vláknitý až rhizoidní	knoflíkovitý s zvýrazněným středem	pastovitá
<i>Clostridium intestinale</i> , CAPM 6397	do 1 mm	bílá, lesklá, neprůsvitná	okrouhlý	hladké	vypouklý	tuhá, vlhká

Tabulka 12: *Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Reinforced Clostridial Broth*

Kmen	Velikost	Barva	Okraje	Tvar	Profil	Konzistence
<i>Clostridium histolyticum</i> , CAPM 5943	do 1 mm	běžová nádech do žlutá, neprůsvitná	zvraštělé	sektorový	knoflíkovitý	pastovitá
<i>Clostridium novyi</i> , CAPM 5949	1 - 4 mm	běžová, neprůsvitná	zvraštělé	sektorový	knoflíkovitý	měkká, granulovitá
<i>Clostridium perfringens</i> , CAPM 5744	3 - 5 mm	běžová, neprůsvitná	vroubkované	sektorový	zvýšený	granulovitá
<i>Clostridium perfringens</i> , CAPM 5872	2 - 8 mm	běžová, ovliv. barvou půdy	zvraštělý	sektorový	mírně zvýšený s knoflíkovitým středem	granulovitá
<i>Clostridium septicum</i> , CAPM 5743	2 - 3 mm	bílá až světle běžová	zvlněný až zvraštělý	sektorový	plochý	granulovitá
<i>Clostridium sporogenes</i> , CAPM 6329	8 - 1 mm	světle běžová	zvraštělý	sektorový	zvýšený	granulovitá

Tabulka 13: *Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Reinforced Clostridial Broth*

Kmen	Velikost	Barva	Okraje	Tvar	Profil	Konzistence
<i>Clostridium butyricum</i> , CAPM 6342	0,5 - 1 mm	bílá, neprůsvitná	rhizoidní	sektorový	zvýšený	pastovitá, hladká
<i>Clostridium difficile</i> , CAPM 6244	2 - 6 mm	běžová, neprůsvitná	rhizoidní	sektorový	plochý s vypouklým středem	granulovitá
<i>Clostridium ramosum</i> , CAPM 6343	4 mm	bílé, neprůsvitná	vroubkovaný	laločnatý	plochý	pastovitý až granulovitá
<i>Clostridium intestinale</i> , CAPM 6397	1 - 2 mm	bílá, neprůsvitná	hladké	okrouhlý	vypouklý	hladká

Tabulka 14: *Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Wilkins Chalgren Anaerobic Agar*

Kmen	Velikost	Barva	Okraje	Tvar	Profil	Konzistence
<i>Clostridium histolyticum</i> , CAPM 5943	1 mm	běžová, neprůsvitná	zubaté	sektorový	hladký, lehce zvýšený	hladká, pastovitá
<i>Clostridium novyi</i> , CAPM 5949	2 - 7 mm	běžová, až světle hnědá, neprůsvitná	rhizoidní	sektorový	knoflíkovitý	pastovitá
<i>Clostridium perfringens</i> , CAPM 5744	1 mm	běžová, neprůsvitná	rhizoidní	okrouhlý, až lehce zvlněný	vypouklý	pastovitá
<i>Clostridium perfringens</i> , CAPM 5872	4 - 7 mm	běžová, s nádechem barvy půdy, průsvitná	rhizoidní	sektorový	knoflíkovitý	pastovitá
<i>Clostridium septicum</i> , CAPM 5743	1 mm	bílá do světle béžové, neprůsvitná	hladké	okrouhlý	vypouklý	hladká, pastovitá
<i>Clostridium sporogenes</i> , CAPM 6329	10 – 20 mm	světle béžová, neprůsvitná	rhizoidní	sektorový	knoflíkovitý	hladká, pastovitá

Tabulka 15: Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Wilkins Chalgren Anaerobic Agar

Kmen	Velikost	Barva	Okraje	Tvar	Profil	Konzistence
<i>Clostridium butyricum</i> , CAPM 6342	3 - 4 mm	bílá, neprůsvitná	hladké	okrouhlý, mírně	zvýšený	jemně granulovitá
<i>Clostridium difficile</i> , CAPM 6244	přerostlá kolonie	běžová, průsvitná	zubaté	sektorový	zvýšený	hladká, prstovitá
<i>Clostridium ramosum</i> , CAPM 6343	2 – 5 mm	bílá	rhizoidní	sektorový	vypouklý s zvýrazněným středem	konzistence
<i>Clostridium intestinale</i> , CAPM 6397	2 - 5 mm	bílá	rhizoidní	sektorový	vypouklý s vyvýšeným středem	hladká, pastovitá
<i>Clostridium histolyticum</i> , CAPM 5943	2 - 4 mm	bílá, lehce s nádechem barvy půdy, neprůsvitná	zubaté	okrouhlý	knoflíkovitý	hladká, tuhá

Pro bližší charakteristiku růstu a pozorování rozdílných vlastností vybraných kmenů klostridií bylo testováno 5 různých druhů půd určených pro růst anaerobních mikroorganismů. Tyto druhy půd jsou vybrány pro své specifické vlastnosti. Na každém médiu vyrostly jednotlivé kolonie, které byly přeočkovávány pro dosažení čistoty kultury pro následnou PCR reakci, kterou lze získat DNA v množství řádově 10^6 .

Na půdě Perfringens Agar Base se potvrdila specifika této půdy pro *Clostridium perfringens*, kde vyrostlé kolonie měly typické černé terčiky na knoflíkovitém profilu jednotlivých kolonií. U ostatních kolonií se tento diagnostický znak neprojevil.

6.2 PCR

Pro amplifikaci DNA byl zvolen druh *Clostridium butyricum* CAPM 6342, který bývá často přítomen v kravském mléku a ovlivňuje jeho kvalitu a kvalitu mléčných výrobků z něj připravených. Bývá příčinou tzv. pozdního duření sýrů.

V první fázi byla testována metoda PCR, ve které sloužila jako DNA matrice DNA izolovanou fenol-chloroformovou metodou. Agarosovou elektroforézou bylo ověřeno, že izolovaná DNA byla v dostatečném množství a nebyla příliš degradovaná. Tudíž byla vhodná pro použití v PCR reakcích.

PCR je metoda, která se osvědčila také při využití pro detekci anaerobních bakterií. PCR reakce byla provedena s čistou vyizolovanou kulturou jednotlivých kmenů. Jelikož získávané výsledky nevycházely uspokojivě a PCR aplikace neprobíhala podle očekávaných výsledků, byla navržena PCR s gradientem teplot s cílem optimalizace této metody.

Aby byla zjištěna optimální teplota pro multiplikaci DNA matrice byla jako technika pro optimalizaci reakčních podmínek zvolena gradientová PCR. Použití gradientové PCR tak umožní dosažení maximální identifikace bakterií přítomné ve vzorcích kultur, neboť rod *Clostridium* je fylogeneticky extrémně heterogenní [15].

6.2.1 Optimalizace PCR reakce

Gradient teplot byl zvolen v rozmezí od 55 °C do 61 °C za účelem zjistit, při jaké teplotě se dá očekávat případná amplifikace DNA matrice. K tomuto účelu byl zvolen kmen *Clostridium butyricum* CAPM 6342.

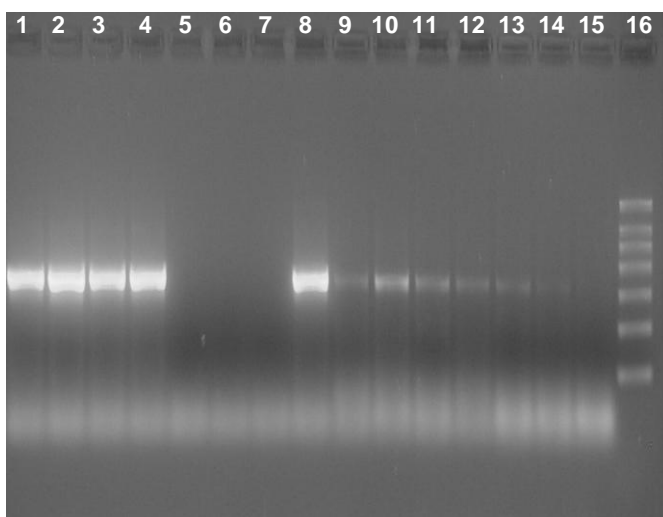
Kromě DNA vyizolované fenol-chloroformovou extrakcí byla použita i další matrice, a to lyzát buněk získaný povařením kolonie bakterií po dobu 30 minut ve sterilní deionizované vodě. Lyzát by měl přispět k vyloučení inhibitorů, zejména chemických činidel používaných při izolaci DNA, které se poté mohou nacházet v PCR směsi a zkreslovat tak PCR amplifikaci

PCR reakční směs byla připravena v celkovém objemu 15 µl (viz níže). Vyizolovaná DNA matrice nebo DNA lyzát byly do PCR směsi přidány v objemu 1 µl a PCR probíhala podle programu uvedeného v kapitole 5.6.3.1 s tím rozdílem, že v kroku 2 (řípojení primerů) byl nastaven teplotní gradient 55 – 61 °C

Složení PCR směsi:

Voda	10,5 μ l
Pufř	1,5 μ l
dNTP	1 μ l
Primery P930 a P932	1 μ l
DNA matrice	1 μ l
Taq – polymerasa	0,15 μ l

Výsledek gelové elektroforézy ukazuje Obrázek 12. Na gel bylo nanášeno 15 μ l PCR amplikonu a 4 μ l nanášecího pufřu (stejně jako v dalších experimentech, pokud nebude uvedeno jinak).

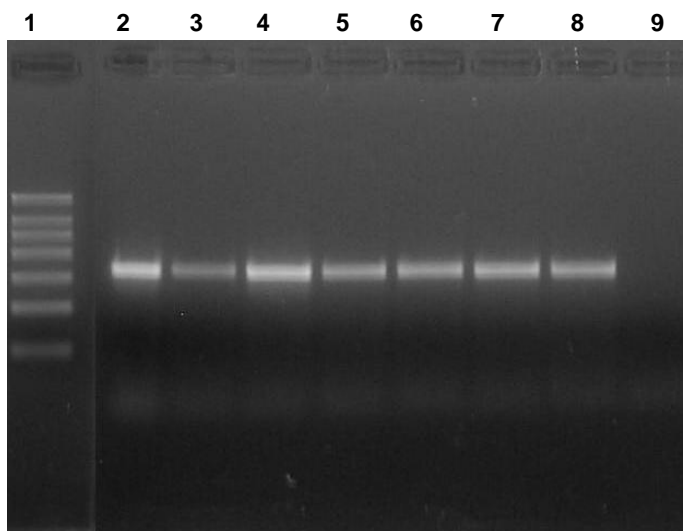


Obrázek 12: Gelová elektroforéza PCR produktů získaných při PCR s teplotním gradientem.

1: gradient při teplotě 61 °C s lyzátem buněk (dále jen Lyz.); 2: Lyz. 60,1 °C; 3: Lyz 59,5 °C; 4: Lyz 58,6 °C; 5: Lyz 57,6 °C; 6: Lyz 56,7 °C; 7: Lyz 56 °C; 8: Lyz 55 °C; 9: gradient při teplotě 61 °C s izolovanou DNA (dále jen DNA); 10: DNA 60,1 °C; 11: DNA 59,5 °C; 12: DNA 58,6 °C; 13: DNA 57,6 °C; 14: DNA 56,7 °C; 15: DNA 56 °C; 16: DNA marker.

Z Obrázek 12 je patrné, že k amplifikaci očekávaného PCR produktu o velikosti 665 bp došlo, pokud byl jako templát použit lyzát buněk a připojení primerů probíhalo při teplotách 61 °C, 60,1 °C, 59,5 °C, 58,6 °C a 55 °C. Byla-li jako DNA matrice použita čistá

DNA izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí, tak byl specifický PCR produkt syntetizován ve všech případech, s výjimkou anealingové teploty 56 °C. Negativní kontrola bez DNA ukázala, že nebyla naamplifikována žádná DNA.



Obrázek 13: Gelová elektroforéza PCR produktů získaných při PCR s teplotním gradientem.

Při přípravě PCR směsi byl použit komerčně dostupný master mix. 1: DNA marker; 2: 61 °C; 3: 60,1 °C; 4: 59,5 °C; 5: 58,6 °C; 6: 57,6 °C; 7: 56,7 °C; 8: 56 °C; 9: 55 °C

Ve druhé fázi byla pro ověření předcházejících výsledků provedena optimalizace v gradientu za stejných podmínek, ovšem s tím rozdílem, že PCR směs byla míchána z komerčně dostupných premixů (master mixu). Jako DNA matrice sloužila v tomto případě DNA izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí. PCR reakční směs byla opět připravena v celkovém objemu 15 µl a složení odpovídalo doporučení výrobce (Roche) s tím, že bylo přepočteno na menší objem, než doporučoval výrobce. Složení PCR směsi bylo následující:

Voda	5 µl
Fast Start Master Mix	7,5 µl
Primery P930 a P932	1,5 µl
DNA	1 µl

Výsledek gelové elektroforézy ukazuje Obrázek 13.

Z obrázku je patrné, že k amplifikaci došlo při všech testovaných teplotách s výjimkou teploty 55 °C. Na základě vizualizace výsledků optimalizace s teplotním gradi-

entem byla vyhodnocena jako optimální teplota pro připojení primerů P930 a P932 na teplátovou DNA teplota 58 °C.

6.2.2 Citlivost reakce s postupně ředěnou DNA matricí

Ve druhé fázi experimentů týkajících se detekce klostridií non-kultivačními technikami byla zjišťována citlivost reakce s primery P930 a P932 a s postupně ředěnou DNA matricí.

Jako DNA matrice byla v první fázi zvolena DNA izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí. Takto vyizolovaná DNA byla ředěna desítkovou řadou až do koncentrace 10^{-7} . Toto ředění bylo připraveno za účelem získání tzv. nejmenšího detekčního limitu. PCR směs byla opět míchána do celkového objemu 15 μ l, a to z jednotlivých komponent.

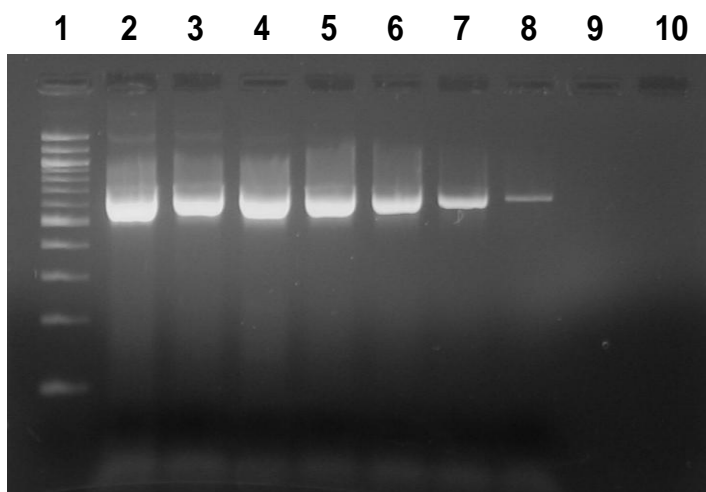
Složení bylo následující:

Voda	10,5 μ l
Puf	1,5 μ l
dNTP	1,0 μ l
Primery P930 a P932	1,0 μ l
DNA	1,0 μ l
Taq polymeráza	0,15 μ l

Výsledky PCR amplifikace byly opět vizualizovány pomocí agarosové gelové elektroforézy, jak uvádí Obrázek 14. Z obrázku je patrné, že detekční limit metody s použitím výše uvedených primerů a DNA izolované fenol-chloroformovou extrakcí je poměrně nízký a že je možné získat PCR produkt ze vzorku až 1 000 000 x zředěného. Jestliže byla koncentrace izolované DNA odhadnuta pomocí gelové elektroforézy na základě srovnání s hmotnostním markerem na cca 50 μ g/ml, tak lze říci, že byly řádově detekovány desítky až stovky femptogramy DNA.

Z obrázku je rovněž patrné, že u dvou nejvyšších použitých koncentrací DNA došlo kromě žádaného amplikonu ve vysoké koncentraci také k tvorbě nespecifických produktů. V případě dalších dvou ředění (100 x a 1000 x) byly detekovány poměrně silné proužky značící vysokou koncentraci detekovaného fragmentu. Za optimální koncentraci, respektive ředění, DNA matrice tak lze označit DNA v koncentracích 10^{-4} a 10^{-5} .

U negativní kontroly k multiplikaci produktu nedošlo. Tím se potvrdila skutečnost, že vzorek bez DNA matrice nebyl kontaminován.



Obrázek 14: Gelová elektroforéza znázorňující citlivost reakce s izolovanou DNA.

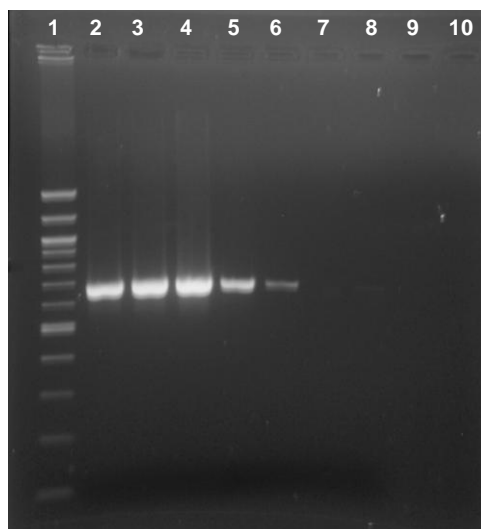
1: 100 bp marker; 2: neředěná DNA; 3: DNA o koncentraci 10^{-1} ; 4: DNA o koncentraci 10^{-2} ; 5: DNA o koncentraci 10^{-3} ; 6: DNA o koncentraci 10^{-4} ; 7: DNA o koncentraci 10^{-5} ; 8: DNA o koncentraci 10^{-6} ; 9: DNA o koncentraci 10^{-7} ; 10: negativní kontrola bez DNA.

Ve druhé fázi tohoto experimentu byl ověřován detekční limit PCR s použitím primerů pro potravinářsky významná klostridia (P930 a P932) a DNA maticí v podobě hrubých lyzátů buněk získaných jejich povařením. Lyzáty buněk *Clostridium butyricum* CAPM 6342 byly opět ředěny až do koncentrace 10^{-7} . Složení PCR směsi i použitý program byly stejné jako v případě použití izolované DNA.

Výsledky ukazuje Obrázek 15. V tomto případě byl získán požadovaný PCR produkt o velikosti 665 bp tehdy, pokud byl jako DNA matrice použit lyzát buněk do koncentrace 10^{-4} . Velmi slabé PCR produkty lze pozorovat i při použití lyzátů o ředění 10^{-5} a 10^{-6} , nicméně tyto výsledky nejsou zcela průkazné (Obrázek 15). Z výsledků je tedy patrné, že postupné vyředování templátové DNA ovlivňuje schopnost amplifikace PCR matrice. Negativní kontrola opět potvrdila čistotu připravené směsi.

Postupné vyředění DNA matrice se provádí za účelem odstranění případných přítomných inhibitorů v směsi, což se projevilo i v tomto případě, kdy bylo ve vzorku získa-

ném se 100x ředěným lyzátem získáno větší množství PCR produktu než v případě neředěné nebo 10x ředěné matrice.



Obrázek 15: Gelová elektroforéza znázorňující citlivost reakce s lyzáty buněk.

1: 100 bp marker; 2: neředěný lyzát; 3: lyzát o koncentraci 10^{-1} ; 4: lyzát o koncentraci 10^{-2} ; 5: lyzát o koncentraci 10^{-3} ; 6: lyzát o koncentraci 10^{-4} ; 7: lyzát o koncentraci 10^{-5} ; 8: lyzát o koncentraci 10^{-6} ; 9: lyzát o koncentraci 10^{-7} ; 10: negativní kontrola bez DNA.

Pro optimalizaci PCR reakce byl vybrán kmen *Clostridium butyricum* CAPM 6342, jehož spory jsou často přítomny v mléku a mléčných výrobcích a svými účinky prostřednictvím vylučovaných toxinů mohou způsobovat různé vady mléčných výrobků, převážně sýrů. Jedná se o tzv. pozdní duření sýrů. Kombinace PCR primerů P930 a P932 se ukázala jako vysoce specifická metoda pro detekci anaerobních klostridií bez kultivační metody.

Jelikož v této práci hrála podstatnou roli především čistota a preciznost provedené práce, tak se pro její kontrolu používala purifikovaná DNA. Pro možné praktické využití této metody se rovněž ověřovalo složení PCR směsi, ve které byla purifikovaná DNA nahrazena lyzátem buněk. Lyzát se získal povařením kolonie bakterií po dobu 30 minut při 100°C .

Cílem práce bylo ověřit, zda je navržená metoda použitelná pro detekci klostridií v potravinách a zda ji lze použít nejen pro čistou vyizolovanou DNA, ale také pro lyzát buněk nebo případně i pro směsné kultury. Proto byla PCR prováděna i se vzorky s klesajícím množstvím přítomné DNA matrice, kdy prováděným ředěním byla zjištěna minimální citlivost dané metody pro co nejnižší přítomné množství DNA matrice, které lze

použit pro amplifikaci DNA. Výsledky rovněž potvrdily, že pro purifikovanou izolovanou DNA jsou detekční limity metody

Práce byla zaměřena na klostridie, které se běžně vyskytují nejen v potravinách, ale jejichž spory bývají často přítomny všude kolem nás. Při dosažení optimálních podmínek pro jejich růst a rozmnožování mohou způsobit kontaminaci a znehodnocení potravin a potravinářských surovin (maso, mléko), případně i zemědělských produktů (např. siláží) a stávají se tak nebezpečné pro člověka.

Tyto bakterie, včetně jejich spor, jsou obtížněji detekovatelné běžnými kultivačními metodami než ostatní aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie, a mohou tak podávat zkreslené výsledky. Také doba pro jejich detekci je poměrně dlouhá ve srovnání s jinými bakteriemi a moderními technikami. Proto se pro jejich detekci zavádí nové moderní techniky, včetně PCR. V této práci se potvrdila vysoká senzitivita této metody, když amplikace vyizolované DNA matrice vybraného druhu (*Clostridium butyricum*) proběhla úspěšně i pro velmi zředěnou kulturu, tj. pro ředění 10^{-6} . V případě většího naředění DNA matrice tak můžeme vyloučit případný falešně negativní výsledek v důsledku přítomnosti případných intra- nebo extracelulárních inhibitorů, které se mohou nacházet ve vzorcích. Z toho lze usoudit, že v našem případě pravděpodobně proběhla inaktivace inhibitorů ve směsi. Zároveň s negativní kontrolou byla potvrzena čistota kultury.

Podle získaných výsledků z agarosové gelové elektroforézy lze říci, že zvolená metoda je vhodná k použití pro detekci DNA klostridií v potravinách. Také je možné vyvodit, že ji lze aplikovat nejen pro čistou kulturu, ale také i pro lyzáty a případné směsné kultury.

text

ZÁVĚR

Práce byla věnována kultivačním a non-kultivačním technikám pro detekci bakterií rodu *Clostridium* a zjištění jejich přítomnosti v potravinách.

Na základě získaných výsledků lze vyvodit následující závěry:

- pro kultivaci klostridií jsou nutné striktně anaerobní podmínky a bakterie můžeme detekovat nejdříve za 48 hodin,
- potravinářsky významné kmeny klostridií vykazovaly na selektivních půdách odlišnou morfolonii kolonií,
- kultivačními technikami zachytíme životaschopné buňky,
- využitím PCR metody s primery specifickými pro klostridia (P930 a P932) můžeme detekovat přítomnost těchto bakterií v prostředí,
- k detekci přítomnosti klostridií pomocí PCR s výše zmíněnými primery lze kromě purifikované DNA využít i lyzáty buněk získané jejich poškozením,
- detekční limit metody byl nižší v případě použití purifikované DNA,
- metodou klasické PCR nerozlišíme přítomnost životaschopných a mrtvých buněk ve vzorku
- detekce klostridií metodou PCR je rychlejší než v případě klasické kultivace, avšak vyžaduje určité laboratorní vybavení a je celkově náročnější na manuální zručnost a na náklady na detekci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, 3. vyd. Praha: Academia, 2002, 271-273 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [2] McMURRY, J.: *Organická chemie*. 1.vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně Nakladatelství VUTIUM Brno ve spolupráci s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze 2007, 1086-1087 s. ISBN 978-80-214-3291-8, VUT v Brně.
- [3] SAMEK, D.: *Problematika genetických modifikovaných surovin a potravin*, bakalářská práce, Univerita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007.
- [4] HLOBILOVÁ, K.: *Využití metod molekulární biologie při zkoumání kvality potravin*, bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati Ve Zlíně, 2007.
- [5] NYČ, O., JINDRÁK, V., HEDLOVÁ, D., URBÁŠKOVÁ, P.: *Clostridium difficile výsledky předběžného dotazníkového šetření v nemocnicích ČR – aktuální informace*, Zpráva CEM (SZÚ, PRAHA), 2007, 16 (9), 410-411 s. .
- [6] KAŠPÁRKOVÁ, V.: *Toxiny bakterií rodu Clostridium*, bakalářská práce, Univerita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007.
- [7] SAWABE, E., KATO, H., OSAWA, K., CHITA, T., TOJO, N., ARAKAWA, Y., OKAMUR, A, N.: *Molecular analysis of Clostridium difficile at a University teaching hospital in Japan: a shift in the predominant type over a five-year period*, Springer Verlag, 2007, DOI 10.1007/ s. 10096-007-0355-8, EUR J. Clin. Microbial Sufect Dis..
- [8] HEREDIA, N., YBARA, P., HERNANDE, C.,GARCIA, S.: *Extracellular protectans produced by Clostridium perfringens cells at elevated temperatures*, Mexico 2008, Letters applied microbiology ISSN 0266-8254.
- [9] GIEL, J.L., SORG, J.A., SONENSHEIN, A.L., ZHU, J.: *Metabolism of Bile Salts in Mice Influences Spore, Germination in Clostridium difficile*, Department of Mikrobiologie, University of Pennnsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America, 2 Department of Molecular Biology and Mikrobiologie, Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts, United States of America, 2010.

- [10] Dostupné z WWW: <http://www.cboz.cz/radimkramar/mikrobiol.htm>
- [11] LIPOVKÝ, J., PATÁKOVÁ, P., RYCHTER, M., ČÍŽKOVÁ, H., MELZUCH, K.: *Perspektivy produkce butanolu ze škrobnatých a celulosových materiálů*, Chemické listy 103, 479-483, 2009, REFERÁT.
- [12] <http://www.szu.cz/tema/pevence/predbezna-identifikace-anaerobnich-bakterii>
- [13] Kultivační media-laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie.
Dostupné z WWW:
http://webak.upce.cz/...mikrobiologie/Laboratorni_cviceni/.../Kultivace_a_identifikace_mikromycet.pdf
- [14] *Kultivace-metody přímé a nepřímé*, formát.pdf
Dostupné z WWW:
http://botany.upol.cz/prezentace/sedlarova/MB_kultivace_t.pdf
- [15] LE BOURHIS, A.G., SAUVIER, K., DORE, J., GARLIER, J.P., CHAMBA, J.F., POPOFF, M.R., THOLOZAN, J.L.: *Development and validation of PCR primers to assess the diversity of Clostridium spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis applied and enviromental mikrobiology*, Januar 2005, p. 29-38, vol.71, NO.1.
- [16] MENG, X., KARASAWA, T., LOU, K., KUANG, X., WANG, X., LU, G., WANG, CH., YAMAKAWA, K., NAKAMURA, S.: *Characterization of neurotoxic Clostridium butyricum strain isolate from the food implicated in an outbreak of foodborne type E botulism*, Journal of Clinical Mikrobiology, aug. 1997, p.2160-2162, 0095-.1137/97/\$04.0+0, Vol 35.NO 8.
- [17] VESMIR: *Yellowstonský národní park a Taq*, Science Nature 392,
- [18] VOTAVA, M., KOLEKTIV: *Lékařská mikrobiologie II - Přehled vyšetřovaných metod v lékařské mikrobiologii*, Brno 2000, ISBN 80-210-2272-8.
- [19] BETINA, V. a KOLEKTIV: *Mikrobiologiske laboratorne metody*, ALFA, Vydavatelstvo technickej a ekonomickej literatúry, Bratislava 1987.

- [20] GREENWOOD, D., SLACK, R.C.B., PEUTHERER, J.F., A KOLEKTIV: *Lékařská mikrobiologie, přehled infekčních onemocnění: Patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*, GRADA, AVICENUM, 1999, 1.vydání.
- [21] SEDLÁČEK, I.: *Taxonomie prokaryot*, Masarykova univerzita, Brno 2007.
- [22] VOTAVA, M., et al.: *Lékařská mikrobiologie speciální*, NEPTUN 2003, BRNO
- [23] MITCHELL, W.J.,ALBASHER, K.,A.,YAZDANIA,M.: *Factors affecting utilization of carbohydrates by clostridia*, FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS 17 (1995) 317-329.
- [24] SONG, Y.: *PCR-based diagnostics for anaerobi infections*, Anaerobiosis molecular biology, genetics and other aspects-mini review, Anaerobe 11 (2005) 79-91.
Dostupné z WWW: www.elsevier.com/locate/anaerobe
- [25] PRŮŠA, R.: *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*, 2. lékařská fakulta UK, Ústav klinické biochemie a patochemie, Praha.
Dostupné z WWW:
<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa- dna/newlook/default.htm>
- [26] dostupné z WWW: http://is.muni.cz/th/106816/prif_b/bakalarka.txt
- [27] Výroba bioetanolu [online]. [cit. 2009-03-16].
Dostupné z WWW:
http://etext.czu.cz/php/skripta/kapitola.php?titul_key=85&idkapitola=11
- [28] FOLTYS, V., KIRCHNEROVÁ, K.: *Mesophilic and psychrotropic aerobic sporulating microorganism in raw cow's milk*, Archiva Zootechnica, Vol.9, 2006, Slovak Republic.
- [29] POSPÍŠILOVÁ, Z.: *Detekce spirálujících bakterií ve vybraných sterilovaných produktech*, bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007.
- [30] KLEIN, D.: *Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations*, Trends in Molecular Medicine, Vol.8No.6, June 2002.
Dostupné z WWW: <http://tmm.trends.com>

- [31] HENRIKSEN, M., BISGAARD, M., FRANCESCH, M., GABRIEL, I., CHRISTENSEN, H.: *Evaluating of PCR and DNA Sequencing for Direkt Dtection of Clostridium perfringens in the Intestina Tract of Broilers*, AVIAN DISEASE 53:441-448, 2009, FRANCE.
- [32] HAMMEROVÁ, J.: *Fixace molekulového dusíku mikroorganismy*, bakalářská práce, 2006, BRNO.
- [33] KLIMN, N., NIEWENHOF, F. F. J., HOLWERF, J.D., VAN DER WAALS, C. B., WEERKAMP, A., H.: *Indification of Clostridium tyrobutyricum as the causative agent of late blowing of density species – specific PCR amplification*, APPLIED AND ENVIROMENTAL MICROBIOLOGY, August 1995, p. 2919-2924, Vol.61, No. 8 .
- [34] WALTZINGER, F., EBNER, K., LION, T.: *Detection and monitoring of virus infection by real-time PCR*, Molecular agent of medicine 27, 2006, p.254-298
- [35] ALAM, S. I., BANSOD, S., KUMAR, R. B., SENGUPTA, N., SINGH, L.: *Differential proteomic anylysis of Clostridium perfringens ATCC13124; identification of dominant, surface and sructure associated proteins*, BMC Microbiology 2009, 9:162, doi: 10.1186/1471-2180-9-162.
- Dostupné z WWW:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/162>
- [36] VOTAVA, M.: *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*, 1.vydání, nakladatelství Hortus, BRNO 2002, ISBN 80-238-5058-X.
- [37] VAN DER VORM, E. R., VON ROSENTIEL, I. A., SPANJAARD, L., DANKERT, J.: *Gas gangrene in an immunocompromised girl due to a Clostridium infection*, brief reports, Clinical infection disease (CID) 1999, 28, 923-924
- [38] LAVIGNEM J-P., BOUZIGES, N., SOTTO, A., LEROUX, J-L., MICHAUX-CHARACHON, S.: *Spondylodiscitis due to Clostridium ramosum infection in an immunocompetent elderly patient*, Journal of Clinical Microbiology May 2003, p. 2223-2226, Vol.41, No.5.
- [39] KOSOWSKÁ, K., REINHORD, J., RASMUSSEN, L.K., SABAT, A., POSEMPAS, J., KILIAN, M., POULSEN, K.: *The Clostridium ramosum IgA pro-*

- teinasa repuents a novel type of metallandopeptidase*, The Journal of Biological Chemistry, 2002, Vol.277, No.14, p. 11987-11994.
- [40] ČECHOVÁ, L.: *Detekce atypických kmenů bakterií rodu Salmonella pomocí polymerázové řetězové reakce*, diplomová práce, Masarykova univerzita Brno 2000.
- [41] <http://www.cps.ca/english/statements/ID/ID00-02.htm#Epidemiology>
- [42] ELSAYED, S., ZHANG, K.: *Isolation and 16S ribosomal RNA gene sequence-based identification of Clostridium scidens from an intra-abdominal abscess*, ANAEROBE 12 (2006) 12 – 13.
- [43] LEE, W-K., FUJISAWA, T., KAWAURA, S., ITOH, K., MITSUOKA, T.: *Clostridium intestinalis sp. nov., an aerotolerantní species isolated from the recess of cattle and pigs*, International Journal of Systematic Bacter, 1989, p. 334 – 336, Vol.39, No.3, Japan.
- [44] GROSSNER, A., J., KUSEL, K., SCHULZ, D., TRENZ, S., ACKER, G., LOVELL, CH., R., DRAKE, H., L.: *Trophic interaction of the aerotolerant anaerobe Clostridium intestinale and the acetogen Sporomusa rhizae sp. nov. isolated from roots of the black needlerush Juncus roemerianus*, MICROBIOLOGY 2006, 152, 1209-1219, DOI 10.1099/mic.0.28725-0.
- [45] PAZDZIORA, E., MATĚJOVÁ, K.: *Proč je třeba v ambulantních zdravotnických zařízeních dezinfikovat?*, Zpravodaj centra MPI, Zdravotnický ústav se sídlem v Ostravě, 1/2008/ročník4.
- [46] SHIN, Bo-M, LEE, E-J-, KUAK, E-Y, YOO, S., J.: *Comparison of VIDAS CDAB and CDA immunoassay for the detection of Clostridium difficile in a tcdA⁻ tvdB⁺ C.difficile prevalence area*, ANAEROBE 15(2009) 266-269.
- [47] ŠMARDA, J., et al: *Metody molekulární biologie*, MU BRNO, 2005, str.194, ISBN 80-210-3841-1.
- [48] ZAHRADNICKÝ, J. et al: *Mikrobiológia a epidemiológia I*, Vydavateľstvo Osveta, 1991,

- [49] BEDNÁŘ, M., FRANĀKOVÁ, V., SCHINDLER, J., LOUČEK, A., VÁVRA, J.: *Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie*, Marvil, s.r.o., 1996.
- [50] http://www.lfhk.cuni.cz/klinmikrobvyukagitclostridium_perfringens.htm
- [51] <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/PCR.gif>
- [52] http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomembranous_colitis
- [53] http://www.textbookofbacteriology.net/clostridia_2.html
- [54] <http://www.textbookofbacteriology.net/clostridia.html>
- [55] http://www.lfhk.cuni.cz/klinmikrobvyukagitclostridium_perfringens.htm
- [56] http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlets/rtbioclinical-diagnostics/dynPage/open=CNL_HCP_INF_GAS&doc=CNL_HCP_INF_GAS_G_CHP_TXT_2&pubparams.sform=2&lang=en
- [57] <http://biomikro.vscht.cz/documents/hygklinmikroklinika5.pdf>
- [58] KATAYAMA, S., OKUDA, M., NOZU, N., HIROTA, S., YAMASAKI, T., HITSUMOTO, Y.: *Characterization of two putative fibronectin-binding proteins of Clostridium perfringens*, ANAEROBE 15 (2009), 155-159.
Dostupné z WWW: www.elsevier.com/locate/anaerobe
- [59] FUKUSHIMA, H., TSUNNOMOR, Y., SEKI, R.: *Duplex real-time SYBR Green PCR Assay for Detection of 17 Species of Food or waterborne pathogens in stools*, Journal of Clinical Microbiology, Nov.2003, p.5134-5146, Vol.41, No.11
- [60] PEREZ, S., ALVAREZ, S., ALBA, P., BLANCO, J.L., GARCÍA, M.E.: *Detection of toxogenic Clostridium difficile in pig feces by PCR*, VETERINARI MEDICINA, 54, 2009 (8): 360-366.
- [61] FACH, P., POPOFF, M.R.: *Detection of Enterotoxigenic Clostridium perfringens in Food and Fecal symplex with a Duplex PCR and the Slide Latex Agglutination Test*, Applied and Environmental Microbiology, Nov. 1997, p.4232-4236, Vol. 53, No.11.

- [62] HAWKES, F.R., DINSDALE, R., HAWKES, D.L., HUSS, I.: *Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation*, International Journal of Hydrogen Energy 27 (2002), 1339-1347.
- [63] LUKINMAA, S., NAKARI, U-M., EKLUND, M., SITONEN, A.: *Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens*, APMIS 112: 908-29, ISSN 0903-4641, 2004.
- [64] BARTH, H., AKTORIES, K., POPOFF, M.R., STILES, B.: *Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology and Bacillus Proteins*, Mikrobiology and Molecular Biology, Reviews, Sp. 2004, p.373-402, Vol. 68, No.3.
- [65] GARCÍA, A., AYUSO, D., BENÍTEZ, S.M., GARCÍA, W.L., MARTÍNEZ, R., SANCHEZ, S.: *Clostridium novyi infection causing sow mortality in an Iberian pig herd raised in an outdoor rearing system in Spain*, Journal of Swine Health and Production, 2009, 17 (5), 264-268.
- Dostupné z WWW: <http://www.aasv.org/shop.html>.
- [66] COCOLIN, L., INNOCENTE, N., BIASUTTI, M., COMI, G.: *The late blowing in cheese: a new molecular approaches based on PCR and PGGE to study the microbial ecology of the alteration process*, International Journal of Food Microbiology 90 (2004), 83-91.
- Dostupné z WWW: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro.
- [67] SJOLIN, S.U, HANSEN, A.K.: *Clostridium septicum gas gangrene and an intestinal malignant lesion*, The Journal of Bone and Joint Surgery, 1991, 73: 772 - 773
- [68] OH, M-H., PARK, S-H., KIM, H-Y., JUNG, G-Y., OH, S.: *A rapid and sensitive Method for detecting foodborne pathogens by capillary electrophoresis – based single – strand conformation polymorphism*, Food Kontrol 19 (2008), 1100-1104.
- Dostupné z WWW: www.elsevier.com/locate/foodcont
- [69] ANNIBALI, F., FENICIA, L., FRANCIOSA, G., AURELI, P.: *Influence of pH and Temperature on the Growth of and Toxin Production by Neurotoxicogenic strains of Clostridium butyricum Type E*, Journal of Food Protection, 2002, p.1267-1270, No.8

-
- [70] DENDUKURI, N., COSTA, V., MCGREGOR, N., BROPHY, J.M.: *Probiotic therapy for the prevention and treatment of Clostridium difficile –associated diarrhea: a systematic review*, CMAS 2005, 173 (2): 167-170.
- [71] <http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/BakteriologijaM3.pdf>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ČR	Česká Republika
WHO	World Health Organization
DNA	deoxyribonukleová kyselina
cDNA	komplementární (complementary) deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvojitá (double stranded) deoxyribonukleová kyselina
CDA	<i>Clostridium difficile</i> associated
SZÚ	Státní zemědělský ústav
UV	ultrafialové světlo
PCR	polymerázová řetězová reakce
RT-PCR	real-time PCR
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů
SSCP	jednovláknový konfirmační polymorfismus
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
TGGE	teplotní gradientová gelová elektroforéza
PFGE	elektroforéza v pulsujícím poli
dNTP	deoxynukleotid-trifosfát
UNG	uracil-N-glykolysa
4-AMDMIP	4-amino-ethyl-4,5-dimethyl-isopsoral
TEMED	tetramethylendiamin
GLU	glukóza
LAC	laktóza
SUC	sacharóza
TRE	therralóza
MAN	manitol

INO	inositol
ORN	ornithin
LYS	lysin
ARG	arginin
IND	indol
SCI	citrát dle Simmons
URE	urea
ONPG	ortho-nitrophenyl- β -galaktosidázový test
OXI	cytochromoxidázový test
MPN	metoda nejpravděpodobnějšího počtu

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Příklady klostridií a jejich spor [57].....	14
Obrázek 2: Bakteriální endospora.....	15
Obrázek 3: <i>Barvený vzorek hnisu alespoň s třemi druhy klostridií</i> [54]	19
Obrázek 4: <i>Clostridium perfringens</i> [55]	20
Obrázek 5: Plynatá snět [57].....	21
Obrázek 6: <i>Clostridium perfringens a jeho možné vstupy infekce</i> [57].....	22
Obrázek 7: <i>Clostridium difficile</i> [53].....	24
Obrázek 8: <i>Pseudomembranózní enterokolitida esovitého tračníků</i> [52].....	25
Obrázek 9: <i>Clostridium ramosum – Gramovo barvení zobrazující variabilitu rodu</i>	26
Obrázek 10: <i>Navržený postup pro vyšetření vzorků s podezřením na výskyt Clostridium difficile</i> [56].....	32
Obrázek 11: <i>Průběh PCR reakce</i> [51]	52
Obrázek 12: <i>Gelová elektroforéza PCR produktů získaných při PCR s teplotním gradientem.</i>	91
Obrázek 13: <i>Gelová elektroforéza PCR produktů získaných při PCR s teplotním gradientem.</i>	92
Obrázek 14: <i>Gelová elektroforéza znázorňující citlivost reakce s izolovanou DNA.</i>	94
Obrázek 15: <i>Gelová elektroforéza znázorňující citlivost reakce s lyzáty buněk.</i> 95	Seznam tabulek

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: <i>Identifikační schéma vybraných klinicky důležitých mikroorganismů.</i> [21].....	31
Tabulka 2: <i>Indikátory redoxního potenciálu</i> [19].....	41
Tabulka 3: <i>Izotopy využívané ke značení molekul nukleových kyselin</i> [25].....	61
Tabulka 4: <i>Závislost koncentrace agarosového gelu na velikosti dělených fragmentů</i> [25].	62
Tabulka 5: <i>Porovnání vybraných metod vhodných pro detekci neznámé mutace</i> [25].....	65
Tabulka 6: <i>Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Anaerobic Agar</i>	80
Tabulka 7: <i>Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Anaerobic Agar</i>	81
Tabulka 8: <i>Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Perfringens Base Agar</i>	82
Tabulka 9: <i>Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Perfringens Base Agar</i>	83
Tabulka 10: <i>Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Fluid Thioglycollate Agar</i>	84
Tabulka 11: <i>Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Fluid Thioglycollate Agar</i>	85
Tabulka 12: <i>Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Reinforced Clostridial</i> <i>Broth</i>	86
Tabulka 13: <i>Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Reinforced Clostridial</i> <i>Broth</i>	87
Tabulka 14: <i>Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Wilkins Chalgren</i> <i>Anaerobic Agar</i>	88
Tabulka 15: <i>Vzhled kolonií testovaných klostridií na půdě Wilkins Chalgren Anaerobic</i> <i>Agar</i>	89

SEZNAM PŘÍLOH

P I: ANAEROCULT S 10 PETRIHO MISKAMI

P II: *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* CAPM 6342 NA PŮDĚ REINFORCED CLOSTRIDIAL AGAR

P III: *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* CAPM 6244 NA PŮDĚ PERFRINGENS BASE AGAR

PŘÍLOHA

P I: ANAEROCULT S 10 PETRIHO MISKAMI



P II: *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* CAPM 6342 NA PŮDĚ REINFORCED CLOSTRIDIAL AGAR



**P III: *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* CAPM 6244 NA PŮDĚ PERFRINGENS BASE
AGAR**

