

# Detekce faktorů virulence u kmenů *Escherichia coli* metodou PCR

Bc. Miluše Knechtlová

---

Diplomová práce  
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Miluše KNECHTLOVÁ**  
Osobní číslo: **T10512**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Detekce faktorů virulence u kmenů Escherichia coli metodou PCR**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Základní charakteristika Escherichia coli, rozdělení do fylogenetických skupin, výskyt v potravinech
2. Faktory virulence E. coli
3. Metody detekce faktorů virulence E. coli

### II. Praktická část

1. Detekovat výskyt vybraných faktorů virulence u kmenů E. coli izolovaných z potravin metodou PCR
2. Na základě získaných výsledků formulovat závěry

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie obecná. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-868-5000-5.
2. HOLKO, Ivan, Tatiana BISOVA, Zuzana HOLKOVA a Vladimír KMET. Virulence markers of Escherichia coli strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. Food Control. 2006, roč. 17(č. 5), 393-396. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.01.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713505000368>
3. OHNSON, T. J. a L. K. NOLAN. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of Escherichia coli. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2009-11-29, roč. 73(č. 4), 750-774. DOI: 10.1128/MMBR.00015-09. Dostupné z: <http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00015-09>
4. GERMON, P., Y. CHEN, L. HE, J. E. BLANCO, A. BRÉE, C. SCHOULER, S. HUANG a M. MOULIN-SCHOULEUR. IbeA, a virulence factor of avian pathogenic Escherichia coli. Microbiology. 2005-04-01, roč. 151(č. 4), 1179-1186. DOI: 10.1099/mic.0.27809-0. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.27809-0>

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.**

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**6. ledna 2012**

Termín odevzdání diplomové práce:

**21. května 2012**

Ve Zlíně dne 15. února 2012

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
děkan



  
doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Knechtlová Miluše, Bc.

Obor: THEVP

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 7.5.2012



<sup>1)</sup> 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.

<sup>2)</sup> 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).

<sup>3)</sup> 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Patogenita je schopnost daného mikroorganismu vyvolávat onemocnění u konkrétního hostitele. Virulence je míra patogenity a je dána počtem faktorů virulence. V této práci jsou charakterizovány faktory virulence u *Escherichia coli*. Dále byly popsány metody molekulární biologie zaměřené na detekci faktorů virulence, převážně metoda PCR, která byla použita i v praktické části. Cílem praktické části bylo detekovat vybrané faktory virulence *iss*, *papC*, *neuC*, *iucD*, *tsh* a *vat* u daného souboru kmenů *E. coli* izolovaných z potravin. Bylo testováno celkem 45 kmenů *E. coli*, z nichž asi 2/3 vykazovaly přítomnost určitého faktoru virulence nebo jejich kombinaci.

Klíčová slova: potraviny, *Escherichia coli*, polymerázová řetězová reakce (PCR), faktory virulence

## **ABSTRACT**

Pathogenicity is the ability of the organism to cause disease in a host. The degree of virulence and pathogenicity is determined by the number of virulence factors. The theoretical part of the thesis describes and characterizes the virulence factors of *E. coli*. Furthermore, the methods of molecular biology of the detection (mainly PCR) of virulence factors are noticed. In the practical part, PCR was used to detect virulence factors (*iss*, *iucD*, *neuC*, *papC*, *tsh*, *vat*) in a given set of *E. coli* strains isolated from food. A total of 45 strains *E. coli* were tested, of which about 2/3 showed the presence of a virulence factor or their combination.

Keywords: food, *Escherichia coli*, polymerase chain reaction (PCR), virulence factors

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D., za pomoc, odborné vedení, cenné rady a připomínky ke zpracovávanému tématu.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 ESCHERICHIA COLI</b> .....	<b>12</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA <i>E. COLI</i> .....	12
1.2 VÝSKYT <i>E. COLI</i> V PROSTŘEDÍ .....	13
1.3 ROZDĚLENÍ DO FYLOGENETICKÝCH SKUPIN .....	14
<b>2 VIRULENCE A PATOGENITA</b> .....	<b>15</b>
2.1 FAKTORY VIRULENCE .....	16
2.1.1 Adhesiny .....	17
2.1.2 Toxiny .....	18
2.1.3 Bakteriociny .....	19
2.2 PATOGENNÍ KMENY <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	20
<b>3 METODY DETEKCE FAKTORŮ VIRULENCE</b> .....	<b>23</b>
3.1 ELEKTROMIGRAČNÍ METODY .....	23
3.2 IMUNOCHEMICKÉ METODY .....	24
3.3 GENOTYPOVÉ METODY .....	24
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>28</b>
<b>4 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>29</b>
<b>5 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>30</b>
5.1 MATERIÁL .....	30
5.1.1 Přístroje .....	30
5.1.2 Chemikálie .....	30
5.1.3 Použité kmeny.....	32
5.2 METODY .....	34
5.2.1 Příprava vzorků DNA .....	34
5.2.2 Příprava vzorků pro PCR.....	34
5.2.3 Amplifikace PCR .....	36
5.2.4 Detekce PCR produktů .....	37
<b>6 VÝSLEDKY</b> .....	<b>38</b>
6.1 DETEKCE FAKTORŮ VIRULENCE <i>ISS, IUCD, NEUC, PAPC, TSH, VAT</i> .....	38
6.1.1 Multiplex PCR .....	44
6.2 DETEKCE FAKTORŮ VIRULENCE <i>CNF1, CNF2, LTI, STI, STII, VT1, VT2</i> .....	46
<b>7 DISKUZE</b> .....	<b>48</b>



7.1 ISS.....	48
7.2 PAPC.....	48
7.3 NEUC.....	49
7.4 IUCD.....	49
7.5 TSH.....	50
7.6 VAT.....	50
7.7 MULTIPLEX PCR.....	51
7.8 PRODUKCE TOXINŮ JAKO FAKTOR VIRULENCE.....	52
<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>53</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>54</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>65</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>66</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>67</b>

## ÚVOD

Bakterie *Escherichia coli* se běžně vyskytuje v intestinálním traktu člověka a teplotokrevných živočichů. Obývá spodní část střevního traktu. Její přítomnost ve vodě nebo v potravinách je ukazatelem fekálního znečištění. Tato bakterie se řadí k nejprobádanějším a slouží jako modelový organizmus pro biochemické a genové studie. Již od roku 1935 je známá jako původce průjmových onemocnění. Vzhledem k produkci některých vitamínů, zejména vitamínu B<sub>12</sub>, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> je bakterie ve střevě prospěšná. Může působit jako bariéra pro ostatní mikroorganismy.

*Escherichia coli* se řadí mezi podmíněně patogenní bakterie a je schopna vyvolávat různé typy infekcí. Mimo střevo je *E. coli* ve většině případů patogenní. V intestinálním traktu je patogenita možná v případě, že je kmen vybaven specifickými faktory virulence. Patogenní kmeny *E. coli* mohou vyvolávat dva typy onemocnění. Intestinální, což jsou různé průjmové infekce a extraintestinální, což mohou být infekce močových cest, infekce ran, může způsobovat i nozokomiální infekce a meningitidy.

Onemocnění způsobená patogenními kmeny *Escherichia coli* se šíří fekálně orální cestou, kontaminovanými potravinami nebo vodou. Dalšími možnými zdroji nákazy mohou být potravinářské suroviny z nakažených hospodářských zvířat.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

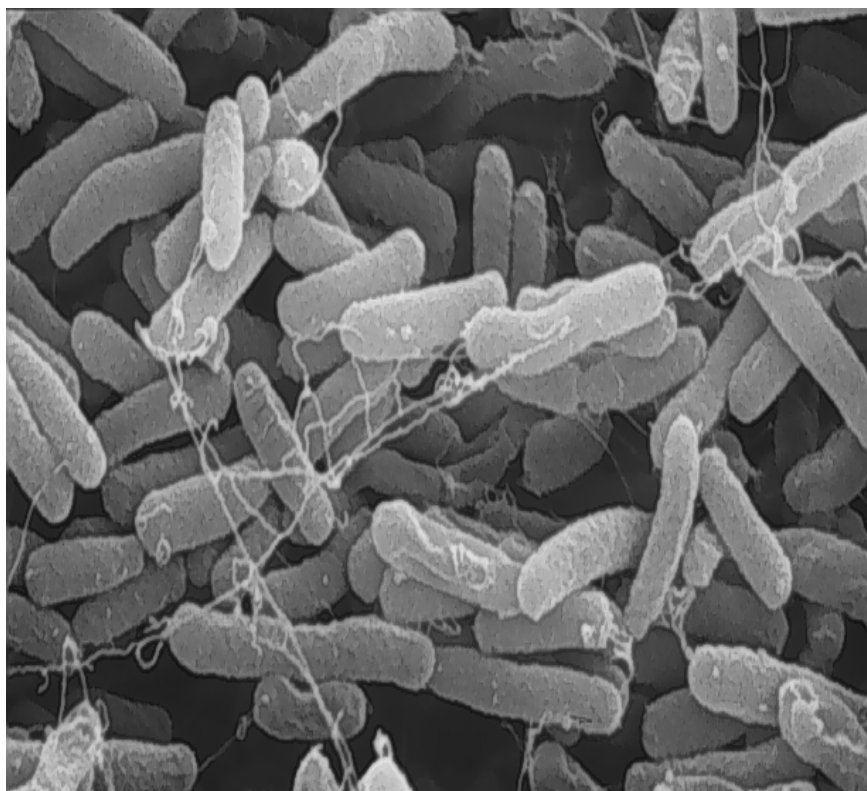
## 1 *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli* (pův. *Bacterium coli*) je gramnegativní fakultativně anaerobní, nesporující pohyblivá tyčinkovitá bakterie (Obr. 1), patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, která sdružuje gramnegativní střevní tyčinkovité bakterie a má velký význam z hygienického hlediska. V potravinářství je nutné jí věnovat velkou pozornost [4]. Tato čeleď zahrnuje velké množství patogenních rodů. *E. coli* se vyskytuje v trávicím traktu teplokrevných živočichů a člověka [1]. Slouží jako modelový organismus pro genetické a biochemické studie prokaryotické buňky. *E. coli* se nachází v dolní části trávicího traktu člověka a teplokrevných zvířat, a tím pádem ve výkalech. Přítomnost v potravinách a vodě je tedy ukazatelem fekálního znečištění. Bakterii objevil rakouský lékař Theodor von Escherich v roce 1885, kdy ji poprvé izoloval z výkalů novorozenců [4].

### 1.1 Charakteristika *E. coli*

Velikost *E. coli* je 2 až 3  $\mu\text{m}$  na délku a 0,6  $\mu\text{m}$  na šířku [2]. Na povrchu může mít dva typy fimbrií. První typ je složen z kyselého hydrofobního proteinu-fimbrinu. Tento typ fimbrií umožňuje bakterii přichytit se na tkáň hostitele a kolonizovat jej. Fimbrie tohoto typu jsou vysoce antigenní (F antigeny). Druhým typem fimbrií jsou sex pili, jsou důležité při konjugaci bakterií [6]. Bakterie se pohybuje pomocí bičičků. Bičičky jsou jako fimbrie taky vysoce antigenní (H antigeny) [6]. H antigeny tvoří polymerizovaná bílkovina flagelin, je to bílkovina bohatá na lysin [2].

Bakterie netvoří spory ani cysty, vyznačuje se dvěma druhy metabolismu, metabolismem respiratorním a metabolismem fermentatorním [1]. *E. coli* rozkládá cukry, např. glukózu, laktózu a některé pentózy za vzniku plynu a kyselin. Z těchto cukrů tvoří kyselinu mléčnou, pyrohroznovou, mravenčí nebo octovou. Část kyseliny mravenčí rozkládá na oxid uhlíčitý a vodík [4]. Je oxidáza negativní, kataláza pozitivní [1]. Optimální teplota růstu je 37 °C. *E. coli* je však schopná růst v rozmezí teplot od 8 °C do 48 °C [1]. Bakterie je schopna vázat molekulární dusík. Buněčnou membránu tvoří tenká vrstva peptidoglykanu. Vnější membránu buňky pokrývá lipopolysacharid složený z lipidové dvojvrstvy, která obsahuje velké množství membránových proteinů [1].



Obr. 1. *Escherichia coli* [21]

## 1.2 Výskyt *E. coli* v prostředí

Bakterie se běžně nachází v půdě, v povrchových i odpadních vodách [18]. Ke kontaminaci potravin nejčastěji dochází při jejich zpracování. Dalšími možnými zdroji mohou být potravinářské suroviny z nemocných hospodářských zvířat [5].

Onemocnění způsobená patogenními kmeny *Escherichia coli* se šíří fekálně orální cestou, kontaminovanými potravinami nebo vodou. *E. coli* je schopna vyvolávat různé typy infekcí. Řadí se mezi podmíněně patogenní mikroorganismy [2]. Mimo střevo je *E. coli* ve většině případů patogenní. K infekcím dochází po požití syrového nebo nedostatečně tepelně upraveného masa, nepasterizovaného mléka a výrobků z nepasterizovaného mléka, další příčinou může být neomytá zelenina a ovoce. Kontaminace syrového mléka může nastat při prvotním ošetření po dojení z náradí a zařízení. Zde *E. coli* slouží jako ukazatel použití správných technologických postupů.

*Escherichia coli* slouží jako indikátorové organizmy při stanovení kvality pitné vody. Pokud jsou přítomny v pitné vodě, upozorňují na půdní či fekální kontaminace a možný výskyt patogenního rodu *Salmonella* [2,18,50].

### 1.3 Rozdělení do fylogenetických skupin

Na základě genetických analýz byla *E. coli* rozdělena do čtyř fylogenetických skupin. Jsou to skupiny: A, B1, B2 a D. Tyto skupiny byly poprvé popsány v roce 1990, Herzer a kol. Jednotlivé fylogenetické skupiny se dělí na základě genetické analýzy několika stanovených markerů - gen *chuA*, který je nutný k transportu hemu, vyskytuje se u EHEC, sérotypu O157:H7, gen *yjaA*, ten se nachází u *E. coli* typu K12, funkce tohoto genu je zatím neznámá a anonymního DNA fragmentu s označením TSPE4.C2, který byl nalezen u kmenů *E. coli* způsobujících novorozenecké meningitidy [7,19].

Komenzální kmeny jsou obvykle řazeny do skupiny A a B1 [7]. Virulentní kmeny intestinnální a extraintestinnální se řadí do skupiny B2 ve většině případů a v menší míře do skupiny D [9].

Zařazení do fylogenetických skupin umožňují různé metody. V současné době se nejvíce využívá metoda PCR, polymerázová řetězová reakce [7,30]. Kromě PCR se využívají i jiné metody, např. elektroforéza polymorfních enzymů nebo hybridizace s DNA sondou, tzv. ribotypizace. Tyto metody jsou poměrně složité a časově náročné. Metodu PCR použil ve své práci Clermont a kol. v roce 2000 [7], kdy bylo testováno 230 kmenů *E. coli* metodou duplex a triplex PCR, což usnadnilo správné zařazení do fylogenetických skupin.

## 2 VIRULENCE A PATOGENITA

Patogenita je schopnost daného mikroorganismu vyvolávat onemocnění u konkrétního hostitelského druhu. Virulence je míra patogenity [14]. Základní součástí virulence a patogenity je invazivita, přenosnost a toxicita [15].

Přenosnost je závislá na rezistenci patogenního mikroorganismu vůči vnějšímu prostředí, na množství mikrobů nutných ke spuštění infekce a na chování hostitele [5,15]. Velké rozdíly mezi organizmy jsou ve velikosti dávky, která je nutná k propuknutí infekce u hostitele, jedná se o tzv. infekční dávku. U shigel je tato dávka poměrně nízká, k infekci stačí stovky, někdy i desítky bakterií, např. u salmonel se infekční dávka pohybuje kolem  $10^8$ . U *E. coli* je infekční dávka také velmi nízká, udává se v hodnotách nižších než 100 [15,20].

Další součástí virulence a patogenity je invazivita. Vyjadřuje schopnost mikroba vstoupit do hostitele a přilnout-adherovat na povrchy, pronikat jimi do vnitřního prostředí hostitele, ve vnitřním prostředí se množit a překonávat obranné mechanismy hostitele [14,15]. K překonání obranných mechanismů hostitele pomáhá i schopnost odolávat účinku komplementu. Tato schopnost je jednou z příčin sérorezistence, což je schopnost patogenního mikroorganismu přežít v krevním séru. Sérorezistence byla potvrzena u kmenů *E. coli* K1, který disponuje velkým množstvím faktorů virulence a způsobuje řadu onemocnění, jako jsou např. různé sepse a novorozenecké meningitidy. Sérorezistence je způsobena jedním ze základních faktorů virulence a tím je pouzdro s kyselinou sialovou [2,15]. Tvoří ho lineární homopolymer  $\alpha$ -2,8-vázané N-kyseliny sialové NeuNAc. Pouzdro poskytuje bariéru proti fagocytóze. Princip je založen na schopnosti koncových zbytků kyseliny sialové inhibovat aktivaci účinku komplementu [40,51]. Biosyntéza a transport pouzdra jsou kódovány na 17-kb klastru genů KPS. Součástí tohoto klastru je gen *neuC*, kódující protein vnější membrány, který je potřebný pro syntézu kyseliny sialové [51]. Klastr KPS je rozdělen na tři funkční oblasti. V oblastech 1 a 3 jsou kódovány proteiny, které zajišťují dopravu pouzdra na povrch bakteriální buňky. Oblast 2 obsahuje *neu* geny, udávající směr pro biosyntézu, aktivaci a polymerázu kyseliny sialové NeuNAc [69].

Produkce toxinů-toxicita je důležitou částí virulence a patogenity mikroorganismů. Toxicita je schopnost mikroba poškozovat svého hostitele. Dochází k němu dvěma způsoby, přímým účinkem agens nebo jeho produktů a reakcí hostitele na samotný agens nebo jeho produkty [15].



## 2.1 Faktory virulence

Patogenita je dána počtem faktorů virulence. Mají vliv na řadu reakcí hostitelské buňky, na syntézu bílkovin a přenos signálu, buněčné dělení a přepis, apoptózu a mitochondriální funkce. Faktory virulence jsou proteiny, které jsou kódovány na mobilních genetických útvarech jako jsou plazmidy, transpozony, bakteriofágy a ostrůvky patogenity [9].

- Plazmidy - jsou nositeli genetické informace ne zcela nezbytné, ale pro buňku výhodné. Existuje několik typů plazmidů, každý disponuje strukturálními geny pro různé proteiny. Plazmidy F (fertilní) obsahují geny, které pomáhají tvořit na povrchu bakterií vlákna, tzv. pilusy. Pomocí těchto vláken bakterie mohou spolu konjugovat a navzájem si předávat genetické informace. Plazmidy R jsou nositeli genů, které buňce zajišťují rezistenci vůči antibiotikům, iontům těžkých kovů aj. Plazmidy s označením Col obsahují geny pro tvorbu kolicinů. Koliciny jsou proteiny, které jsou schopny usmrcovat jak bakterie téhož druhu, tak i jiných druhů. Velikost plazmidů se pohybuje asi od 1 500 bp až do 233 000 bp [21,22]. Plazmid *E. coli* pod názvem pBR322 má velikost 4 362 bp [22].
- Transpozony - jsou krátké úseky DNA, které často migrují mezi různými místy chromozomální DNA, mezi různými plazmidy nebo mezi plazmidem a chromozomem [4]. Mezi transpozony se řadí i některé geny, které mohou být zodpovědné za rezistenci k určitým antibiotikům [21].
- Bakteriofágy - jsou viry napadající bakterie. Genetický materiál tvoří DNA i RNA o délce 5 až 500 tisíc nukleotidů [4,25].
- Ostrůvky patogenity - jsou genetické prvky patogenů kódující různé faktory virulence. U kmenů *E. coli* disponují kódem pro invazivitu, tvorbu adhesinů a enterotoxinů [23]. Byly objeveny kolem roku 1980 u kmenů UPEC, analýzou genu *hly*. Gen se nachází na místě chromozomové DNA, která se nazývá hemolyzinový ostrov. Od té doby byly ostrůvky patogenity nalezeny jak na živočišných patogenech, tak i na rostlinných patogenech. Také u bakterie *Salmonella enterica* je mechanismus faktorů virulence organizován na ostrovech patogenity [65]. Lokusy tRNA jsou významným místem pro začlenění ostrůvků patogenity a často fungují jako integrační místa pro jakoukoliv cizorodou DNA. Spojitost ostrůvků patogenity a tR-

NA lokusů pak pravděpodobně odráží tvorbu ostrovů patogenity horizontálním přenosem [26,65].

### 2.1.1 Adhesiny

U většiny známých patogenů se vyvinul určitý způsob adherence, schopnosti přilnout na povrch hostitelské buňky. Děje se tak pomocí speciálních struktur na povrchu bakterie nebo za pomoci zvláštních bílkovin [15]. V těchto případech se jedná o bakteriální adhesiny, které se mohou dělit do dvou skupin. Do první skupiny patří pili nebo fimbrie, druhý typ se označuje jako nefimbriální adhesiny [20].

- pili, fimbrie - jsou tyčinkovité, duté útvary skládající se ze spirálových pravidelně uspořádaných podjednotek bílkovin. Bývají asi 100 nm dlouhé a asi 5 nm silné. Vlastní adherenci způsobuje receptor na jejich konci, který se schopen specificky reagovat s buňkami epitelie [15]. Fimbrie jsou velmi křehké, bakterie je tedy snadno ztrácí, a proto si musí neustále vytvářet fimbrie nové. Tato neustálá výměna fimbrií je vlastním faktorem virulence, dochází zde ke změně antigenního složení pilinu a bakterie tím získávají obranu proti působení slizničních protilátek. Kmeny *E. coli* způsobující infekce močových cest jsou vybaveny fimbriemi nazývanými jako P-fimbrie. Jsou známé pod označením *papC*, *papG* [2,13]. Dalším typem fimbriálního adhesinu u kmenů *E. coli* je K 88, K 99, 987-P, F 41, *eaeA*. Vyskytují se u virulentních kmenů ETEC [24]. P-fimbrie F11 a F165 byly detekovány i u kmenů způsobující septikémie drůbeže a prasat [49,56]. Fimbriální adhesiny byly poprvé popsány u uropatogenních kmenů *E. coli*. Latham & Stamm ve své práci v roce 1994 uvádějí, že gen pro P-fimbrie je kódován na *PAP* operonu a je umístěn na chromozomu [57].
- nefimbriální adhesiny - jsou nespecifické adhesiny, např. bičík [15,20]. Dalším faktorem virulence je intimin, je to protein vnější buněčné membrány s funkcí adhesinu, kódovaný chromozomálním genem *eae* [9,51]

### 2.1.2 Toxiny

Produkce toxinů a toxicita jsou důležitou částí virulence a patogenity mikroorganismů. Toxicita je schopnost mikroorganismu poškozovat svého hostitele. K poškození hostitele dochází účinkem agens nebo reakcí hostitele na agens [15]. Bakteriální toxiny se dělí na endotoxiny a exotoxiny. Exotoxiny jsou bakteriální proteiny a endotoxiny jsou součástí buněčné stěny a uvolňují se do okolí po rozpadu bakterie [14,15].

Enterotoxigenní kmeny *E. coli* produkují dva typy enterotoxinů. Prvním typem je termolabilní enterotoxin, který je téměř shodný s enterotoxinem bakterie *Vibrio cholerae*, tzv. cholergen a druhým typem je enterotoxin termostabilní [2,17]. Tepelně stabilní enterotoxin ST se vyznačuje nízkou molekulovou hmotností, vyskytuje se ve dvou třídách, první třída aktivuje guanylátcyklázu se zvýšením množství cAMP. Činnost druhé třídy není prozatím jasná. Tepelně labilní toxin LT bývá kódován na plazmidu a skládá se ze dvou podjednotek [56]. Aktivuje membránově vázanou adenylátcyklázu, a to způsobuje velkou produkci cAMP, následkem je pronikání vody a elektrolytů skrze střevní stěnu. Tento enterotoxin je imunogenní [2,17].

U kmenů STEC je hlavním faktorem virulence produkce Shiga-toxinů Stx1 a Stx2. Toxin Stx1 je velmi podobný Shiga toxinu bakterie *Shigella dysenteriae*, zatímco toxin Stx2 se od Shiga toxinu *Shigella dysenteriae* liší [27,28]. Patogenní účinek Shiga toxinů spočívá v inhibici proteosyntézy, která má za následek smrt buňky [27]. Patří tedy do skupiny toxinů brzdící syntézu bílkovin. Většina toxinů této skupiny je složena ze dvou částí. Jedna část přímo odpovídá za vlastní toxickou aktivitu, značí se jako složka A a druhá část je vázána na buněčnou membránu, značí se jako složka B. Poměrně velká část toxinů A-B přenáší adenosindifosfátribosylovou skupinu z NAD na cílovou molekulu [15].

U kmenů VTEC-verotoxigenních je za hlavní faktor virulence považována produkce verotoxinů VT1 a VT2. Verotoxin VT1 je až z 99 % vysoce homologní s shigelovým toxinem, který produkují kmeny *Shigella dysenteriae*. Někdy bývá nazýván jako shigatoxin [2,11]. Zatímco verotoxin VT2 je mnohem více heterologní, s VT1 je identický jen z 55 %. Ze vzorků odebraných zdravým i nemocným zvířatům byly postupně izolovány různé varianty VT2, VT2c, VT2d, VT2e, VT2f. Pomocí PCR byla identifikována *E. coli* produkující novou variantu VT2, a to VT2g. Produkce verotoxinu VT2g byla zjištěna pouze u bovinních kmenů, u lidských kmenů *E. coli* nebyla potvrzena [65].

### 2.1.3 Bakteriociny

Bakteriociny jsou extracelulární proteiny vylučované bakteriemi proti invazi příbuzných mikroorganismů, čímž plní tzv. ekologickou roli [9]. Bakterie *E. coli* produkuje dva typy bakteriocinů, a to koliciny a mikrocinů. Do dnešního dne bylo popsáno 26 typů kolicinů a 9 typů mikrocinů [42].

Koliciny - jsou toxické proteiny o velikosti 30-70 kDa, kódované na Col plazmidech. Vyskytují se v 30-50 % kmenů *E. coli* a některé z nich jsou označovány jako faktory virulence. Mohou usmrcovat jen ty bakterie, jež pro ně mají specifické receptory [2,4]. Reakce bakteriální buňky a kolicinu má tři fáze, kolicin se naváže na specifický receptor ve vnější membráně buňky, nastane translokace přes buněčný obal a následuje vlastní smrtící účinek. Vazbu kolicinu na specifický receptor buňky je zajištěn centrální doménou, prostup přes buněčný obal N-terminální sekvencí a smrtící účinek C-terminální sekvencí [40].

Mikrocinů - jsou další skupinou proteinů produkovaných *E. coli*. Vyznačují se nižší molekulovou hmotností než koliciny, asi do 10 000 Da. Dělí se do dvou skupin, podle biochemických vlastností a mechanismu účinku. Do první skupiny se řadí mikrocinů s molekulovou hmotností menší než 5 000 Da. Sem patří mikrocinů B17, C7, J25. Do druhé skupiny se řadí mikrocinů s molekulovou hmotností vyšší. Zástupci skupiny jsou např. H47, V, L [42,44]. Mikrocinů se dále dělí na modifikované a nemodifikované peptidy. Modifikované mikrocinů jsou peptidy, které před vyloučením prošly tzv. posttranslační modifikací [43,44]. Syntéza mikrocinů se aktivuje při dosažení stacionární fáze růstu buněk, při nedostatku uhlíku a fosforečnanu (mccJ25), při nedostatku oxidu dusíku a fosforečnanu (mccB17) nebo při nedostatku uhlíku v prostředí (mccC51). Předpokládá se, že buňka produkcí mikrocinů inhibuje citlivé buňky ve svém okolí, čímž získá více živin pro sebe [42,43].

## 2.2 Patogenní kmeny *Escherichia coli*

Patogenní kmeny *E. coli* mohou vyvolávat dva typy onemocnění. Intestinální, což jsou různé průjemové infekce a extraintestinální, což mohou být infekce močových cest, infekce ran, může způsobovat i nozokomiální infekce a meningitidy. Kmeny téhož patotypu jsou geneticky podobné a jsou zároveň nositeli stejných faktorů virulence. Podle těchto genů je možné určit patogenní potenciál kmene [11]. Podle působení se kmeny dělí na:

- **enteropatogenní (EPEC)** - vyvolávají převážně vodnaté průjmy, převážně u novorozenců. Při rozsáhlé invazi dochází k vysokému stupni dehydratace organismu a následnému úmrtí. Hlavním faktorem virulence u tohoto typu je silná vazba enterocytů ve střevní stěně s bakterií, při níž dochází k rozpouštění mikrokloků. Mezi nejznámější typy kmene EPEC se řadí O55, O111, O86 a další [2].
- **enterotoxigenní (ETEC)** - kmeny ETEC se vyznačují tvorbou dvou typů enterotoxinu, termolabilního (LT) a termostabilního (ST). Tento kmen vyvolává také vodnaté průjmy [2,8].
- **enterohemoragické (EHEC)** - vyvolávají krvácení ve střevě, může nastat HUS, hemolyticko-uremický syndrom. Bakterie je schopna se vázat na ednotel tlustého střeva, dochází k produkci toxinu zv. shigella toxin, nebo verotoxin. Nejvýznamnější sérotypy jsou *E. coli* O157:H7 a *E. coli* K-12 [13]. Sérotyp O157:H7 je nejdůležitějším zástupcem skupiny EHEC. Nachází se převážně ve střevním traktu přežvýkavců. Na člověka se může přenést kontaminovanou potravou jako je nedostatečně tepelně upravené maso a mléko, při fekálním znečištění vody nebo zkříženou kontaminací. Poprvé byl izolován v roce 1982. Sérotyp K-12 poprvé izolovali z lidské stolice už v roce 1922, je tedy nejprobádanějším sérotypem *E. coli* vůbec. Je hojně využíván v genovém inženýrství, byl použit např. při výzkumu metabolismu dusíku u bakterií, konjugaci bakterií nebo při biosyntéze L-tryptofanu a L-serinu [6,54]
- **enteroinvazivní (EIEC)** - buňky EIEC disponují faktory invazivity, které umožňují buňkám pronikat do tlustého střeva a způsobit onemocnění s podobným průběhem jako bacilární úplavice. U kmenů EIEC má velký význam nefimbriální adhesin-hemaglutinující faktor (HAF). Nejrozšířenějším sérotypem v této skupině je O 124 [2,5].

- **enteroagregativní (EaggEC)** - jako faktor virulence je zde považován gen *aggR*, agregativní adhezenční fimbrie *AAF* [2,10]. Skupina kmenů EAEC určitý čas přežívá uvnitř hostitelských buněk. Tím jsou bakterie chráněny před hostitelským obranným mechanismem, imunitním systémem i antibiotickou léčbou, což může být důvod, proč onemocnění má formu přetrvávajících průjmů [12].
- **difusně adhezní (DAEC)** – mohou způsobovat průjmové onemocnění u dětí. Jako faktor virulence je zde tzv. *afa* operon (*afa/dra/daa*), jeho produkty jsou *AfaD* invasin a *AfaE* adhesin, vážou se na hostitelský protein [2]. Kódují adhezi i faktor způsobující rozkládání různých látek. Mezi další významné faktory virulence se řadí *Afa/Dr* DAEC adhesin. Může se vyskytovat i u některých komenzálních kmenů, aniž by byly přímo patogenní [37].
- **uropatogenní (UPEC)** - tyto kmeny způsobují extraintestinální infekce, převážně infekce močových cest. Disponuje specifickými faktory virulence, adhesiny typu *papC*, *papG*, které umožňují vazbu na epitel močových cest [2,13]. Dále zde byly zaznamenány i další faktory virulence,  $\alpha$ -hemolysin, aerobaktin, gen pro CNF (cytotoxický nekrotizující faktor) a mikrocin V. Kmeny způsobující tyto infekce se řadí do fylogenetické skupiny B<sub>2</sub> a D [42,61].
- **aviární patogenní (APEC)** - způsobují záněty sliznic, septikémie a další onemocnění. Jedná se převážně o extraintestinální onemocnění kuru a jiných druhů ptáků. Aviární patogenní *E. coli* obývají střevní trakt zdravých ptáků [26,29]. Mezi hlavní faktory virulence u APEC se řadí adhesiny F1 a P fimbrie, aerobaktin, K1 pouzdro, termolabilní hemaglutinin Tsh, odolnost vůči baktericidním účinkům séra a cytotoxické účinky a také gen *ibeA*, který kóduje faktor virulence, jež je zodpovědný za novorozenecké meningitidy [58,60]. Studie prokázaly, že P fimbrie se nachází ve vnitřních orgánech infikovaných kuřat a F1 fimbrie v dýchacích cestách [55,58]. Termolabilní hemaglutinin Tsh je serinová bílkovina kódována *tsh* genem. Tento gen se nachází na plazmidech o velké molekulové hmotnosti [57]. Neznámější sérotypy skupiny APEC kmenů patří O1, O2, O5, O8, O18 a O78 [58].

Skupiny kmenů EPEC, ETEC, EHEC, EAEC, EIEC a DAEC tvoří šest nejvíce prozkoumaných kategorií *Escherichia coli*. Nicméně některé zdroje uvádějí i další skupiny, např.

nekrotoxigenní *E. coli* (NTEC) nebo cell-detaching *E. coli* (CDEC), buňky oddělující *E. coli* [15].

Skupina kmenů NTEC je obvykle izolována ze zvířat, přestože její gen pro cytotoxický nekrotizující faktor *cnf3*, je sdružený s geny *eae* a *ehxA*, což by spíše napovídalo možnosti, že se jedná o potenciálního lidského patogena [17,61].

Skupina kmenů CDEC byla dlouho považována za výhradně zvířecí patogeny. Ke změně názoru došlo poté, co se v Brazílii podařilo z několika různých vzorků dětské stolice izolovat tyto kmeny, protože tyto kmeny produkují aerobaktin a byla u nich pozorována rezistence k více druhům antibiotik [16].



### 3 METODY DETEKCE FAKTORŮ VIRULENCE

Mikrobiologické metody detekce patogenních mikroorganismů patří k systému preventivních opatření v rámci bezpečnosti potravin [30]. K detekci faktorů virulence u patogenních mikroorganismů lze použít genotypové a fenotypové metody.

K fenotypovým metodám, které detekují přítomnost proteinu daného faktoru virulence patří metody elektromigrační a imunochemické.

Genotypové metody detekují přítomnost genu sledovaného faktoru virulence metodami amplifikačními a neamplifikačními.

#### 3.1 Elektromigrační metody

Při elektromigračních metodách dochází k separaci částic na základě jejich elektrického náboje. Roztokem prochází stejnosměrný proud a kladně nabitě částice postupují ke katodě, záporně nabitě k anodě. V praxi se tyto metody využívají k separaci a detekci proteinů, peptidů a nukleových kyselin [32,33]. Nejčastěji se pro analýzu peptidů a proteinů používá gelová elektroforéza. Gel vytváří složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost je ovlivněna složením roztoku a koncentrací polymeru [32,45]. Polyakrylamidový gel je umístěn mezi dvěma skleněnými deskami a k denaturaci proteinů slouží negativně nabitý detergent (např. SDS). Používanou metodou je elektroforéza SDS PAGE. Je to reprodukovatelná metoda pro kvalifikovanou charakterizaci a srovnání bílkovin. Tato metoda separuje bílkoviny na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti. SDS se zde váže na bílkovinný řetězec v poměru 1,4 g SDS na 1g bílkoviny, přičemž velikost komplexu SDS-bílkovina je úměrná jeho molekulové hmotnosti. Na základě srovnání relativních mobilit neznámé bílkoviny a standardů se určuje relativní molekulová hmotnost separované bílkoviny [67]. Metoda SDS-PAGE byla použita např. ke studiu *stx2* konvertujícího bakteriofágu z *E. coli* produkující shiga-like toxin [72].

Jednou z modifikací gelové elektroforézy je izoelektrická fokusace. Izoelektrická fokusace se realizuje elektroforetickou technikou. Elektroforéza na nosičích se provádí za konstantního pH, k separaci při izoelektrické fokusaci dochází v gradientu pH, který se ustaví mezi dvěma elektrodami. Separovaná látka se pohybuje vlivem elektrického proudu v gradientu pH až do okamžiku, kdy se dostane do oblasti pH shodné s jeho izoelektrickým bo-

dem.[68]. Tímto způsobem je možno od sebe separovat molekuly, jejichž izoelektrické body se od sebe liší o 0,001 pH jednotky [32,45].

### 3.2 Imunochemické metody

Principem imunochemických metod je vysoce specifická interakce protilátky s nízkomolekulárním antigenem. Nejznámější používanou metodou je metoda ELISA. Je to analytická metoda využívaná ke stanovení různých antigenů. Společným znakem metod ELISA je kovalentní navázání antigenu na nerozpustný nosič vázaný v mikrotitrační destičce [52]. Metodu ELISA lze použít pro stanovení faktorů virulence [48], např. v roce 2002 byla použita u kmenů *E. coli* k detekci fimbriálních adhesinů F11 a F165 [49].

### 3.3 Genotypové metody

Genotypové metody se využívají pro průkaz genu, kódujícího tvorbu daného faktoru virulence a dle lokalizace jsou zaměřeny na analýzu chromozomové, plazmidové či celkové genomové DNA. Tyto metody umožňují zpracování velkého počtu vzorků v poměrně krátkém časovém úseku. Genotypové metody se dělí amplifikační a neamplifikační. K provedení amplifikační analýzy obvykle stačí velmi malé množství vzorku [30,31], naproti tomu u neamplifikačních metod je nutné mít k dispozici větší množství nukleových kyselin. Amplifikační metody jsou nejpřesnější metody s vysokou diskriminační schopností [32]. Do amplifikačních genotypových metod se řadí především polymerázová řetězová reakce (PCR). Objevil a popsal ji v roce 1983 Kary Mullis. V roce 1985 byla uvedena do praxe, jako metoda pro enzymatickou syntézu definované sekvence DNA. V současné době je nejpoužívanější metodou pro analýzu DNA. Detekce mikroorganismů či genotypizace často probíhá ve vzorcích s nízkou koncentrací DNA, proto se s výhodou využívá její mnohonásobná replikace *in vitro* [32]. Analyzuje se biologický materiál, který často kromě DNA obsahuje jiné látky a různé nečistoty, které mohou způsobit inhibici *Taq* DNA-polymerázy. Jelikož pro PCR stačí malé množství templátové DNA, nečistoty mohou být odstraněny i dostatečným naředěním vzorku [32]. Důležitým faktorem úspěšné amplifikace je dodání vhodných oligonukleotidových primerů k zajištění specifity reakce. Při návrhu primerů a při programování reakčního postupu je nutno vycházet z obecné znalosti struktury analyzované DNA a z určení sekvence, ke které jsou navrhované primery komplementární [35].

Velkou výhodou PCR je získání požadované specifické sekvence DNA bez předchozího klonování ve vektorech [32].

Principem PCR je replikace nukleových kyselin, která je základním procesem všech živých organismů. Vlastní podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' za pomoci DNA polymerázy. Po přidání DNA polymerázy a nukleotidů proběhne syntéza nových vláken protisměrně na obou matricových řetězcích [32,36]. V procesu PCR pravidelně střídají tři kroky, při nichž probíhají následující děje (Obr. 2):

- 1. fáze - denaturace dvouřetězcových molekul DNA.

Dochází k záhřevu roztoku na teplotu 94-95 °C, což způsobuje denaturaci dvouřetězcových molekul DNA, rozpadají se vodíkové můstky mezi vlákny DNA, vzniknou dvě jednořetězcové DNA [32].

- 2. fáze - annealing, připojení primerů k odděleným řetězcům.

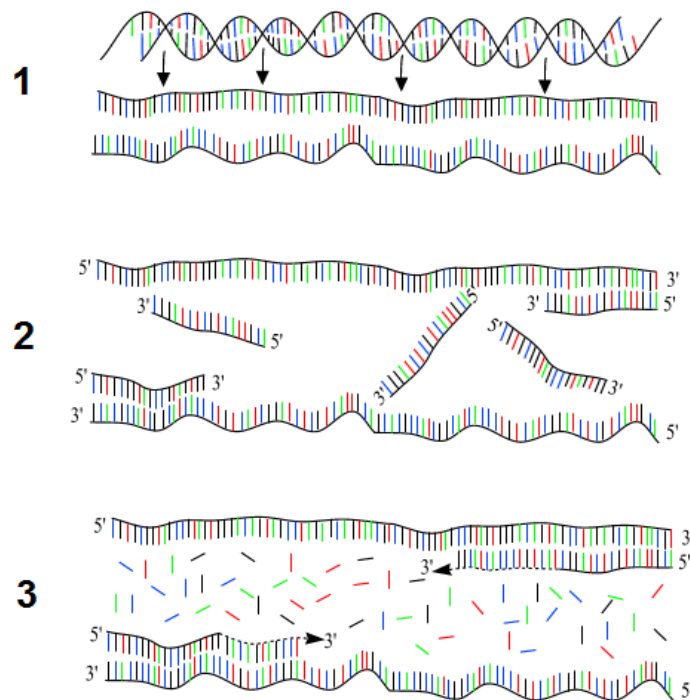
Annealingová teplota se pohybuje v intervalu (30-75 °C). Na úsek nukleotidové sekvence, který je vymezen připojením dvou primerů se vážou tyto primery na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. V PCR se používají vždy dva primery, které nasedají na komplementární sekvence ve dvou templátových vláknech. Templátová vlákna vznikají denurací původně dvouvláknové DNA [32,36]. V případě, že se ve směsi nachází nadbytek specifických oligonukleotidů, budou tyto oligonukleotidy hybridizovat se svou komplementární sekvencí rychleji, než dlouhé jednořetězcové molekuly, jejichž koncentrace ve směsi je nižší. Při velmi nízké teplotě mohou primery nasedat i na sekvence, které jsou komplementární jen z části a tím vytvoří nespécifické produkty. V případě vysoké teploty budou primery málo hybridizovat a vytvoří se jen malé množství produktu. Proto je důležité, aby teplota, při níž hybridizace probíhá, byla vhodně nastavena pro použitý pár primerů [32,36].

- 3. fáze - elongace, syntéza nových řetězců.

Teplota se zvyšuje na 65-75° C, kdy je aktivita DNA polymerázy optimální. Pomocí DNA polymerázy nastává syntéza nových řetězců [32].

Reakce probíhají v termocykleru kde dochází ke změně teploty, automaticky na základě naprogramovaných časových intervalů. Cyklickým opakováním procesu se vytváří expo-

nenciální řadou až miliarda kopií vybraného úseku molekuly DNA. Optimální počet cyklů bývá 25 až 30. Produktem PCR jsou ampliony, jejichž přítomnost v reakční směsi se detekuje pomocí elektroforézy v agarózovém gelu [32,36].



Obr. 2. Schéma polymerázové řetězové reakce [67]

Účelem neamplifikačních metod je sledovat vlastnosti určitého genotypového znaku, markeru [31]. Mezi tyto metody se řadí např. metoda Southern blot. Probíhá zde přenos fragmentů DNA z agarózového gelu, v kterém proběhla elektroforéza na nylonový nebo nitrocelulózový materiál [6,34]. Metoda Southern blot je popsána v práci R. S Gerische a kol. z roku 2007 [72], kdy byla použita jako metoda srovnávací s metodou PCR při detekci faktorů virulence enterohemorragické *E. coli* (EHEC). Ze závěrů vyplývá, že metoda Southern blot se ukázala přesnější než metoda PCR, nebyla tolik ovlivněna sekvenčními variantami, které v určitém případě mohly PCR zcela inhibovat [73]. Kombinace těchto metod byla použita v práci Cooksona a kol. z roku 2002 [74], kdy byly detekovány faktory virulence jako *cnf1*, *cnf2*, *stx1* a *stx2* u kmenů *E. coli* z fekálních vzorků. Faktory virulence byly potvrzeny oběma metodami [74].

### Chemikálie pro PCR reakce

- **tDNA** – templátová DNA je tvořena dvěma komplementárními řetězci spojenými interakcemi dusíkatých bází nukleotidů (A, G, C, T). Lineární sekvence bází dává informaci genetického kódu, kde vždy tři po sobě jdoucí báze určují jednu aminokyselinu. Komplementarita párování bází mezi dvěma řetězci je A s T a G s C.
- **dNTP mix** – je směs volných nukleotidových zbytků dATP (deoxyadenosintrifosfát), dGTP (deoxyguanosintrifosfát), dTTP (deoxytymidintrifosfát) a dCTP (deoxycytidintrifosfát), které se přiřazují DNA-polymerázou do nově vzniklého řetězce [32].
- **MgCl<sub>2</sub>** – přítomnost hořečnatých iontů stabilizuje dvoušroubovici DNA. Velká koncentrace však brání úplné denaturaci. Snižuje se tím specifita nasedání primerů. Pokud je koncentrace iontů nižší než 0,5 mmol/l, nevytvoří se komplex primer-templát nebo se celý komplex krátce po začátku prodlužování rozpadá [32,36].
- **Taq DNA-polymeráza** – DNA polymeráza je enzym, izolovaný z termofilních bakterií, žijících v pramenech horkých až 100 °C. Vykazuje dostatečnou enzymovou aktivitu po celou dobu syntézy. Nejčastěji se používá termostabilní polymeráza *Taq*, která je izolována z bakterie *Thermus aquaticus*. V současné době už však *Taq* DNA-polymeráza nezískává z bakterií, vyrábí se uměle. Teplotní optimum *Taq* DNA-polymerázy se pohybuje okolo 75 °C a poločas inaktivace je asi 40 minut při teplotě 95 °C. Mimo *Taq* DNA-polymerázy se používá i *Pwo* a *Pfu* DNA polymerázy (izolované z termofilních bakterií rodu *Pyrococcus* *woesei* a *Pyrococcus furiosus*) [32,35,36].
- **pufrr** – složení pufru musí odpovídat optimálnímu prostředí pro aktivitu polymerázy, proto každá firma zabývající se výrobou chemikálií pro PCR reakce, dodává k DNA polymeráze i správný pufr
- **primery** - jsou to krátké oligonukleotidové DNA sekvence o velikosti 18 – 30 bází. Jsou to řetězce komplementární vždy k 3' konci oblasti vybrané části templátové DNA. Nasedají na jednovláknovou templátovou DNA a udávají tím od kterého místa má DNA polymeráza začít syntetizovat komplementární řetězec DNA [32,33].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit výskyt vybraných faktorů virulence (*iss*, *iucD*, *neuC*, *papC*, *tsh*, *vat*) metodou PCR u daného souboru 45 kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin. U suspektních vzorků provést detailní analýzu na další faktory virulence (*cnf1*, *cnf2*, *LTI*, *ST1*, *ST2*, *VT1* a *VT2*).



## 5 MATERIÁL A METODY

V praktické části byly provedeny jednotlivé reakce PCR na detekci určených faktorů virulence podle použitých primerů a u vybraných kmenů byla provedena multiplex PCR.

### 5.1 Materiál

#### 5.1.1 Přístroje

- Termostat - BT 120 - Laboratorní přístroje Praha, Česká republika
- Laboratorní chlazená centrifuga 2300K - Hermle Labortechnik, Německo
- Termoblok BIO TDB-100 - Dry Block Heating Thermostat, Litva
- Digitální váha - Kern&Sohn GmbH, Německo
- Automatické mikropipety - Nichiryo, Japonsko
- Termocycler - Bio-Rad , USA
- Elektroforéza - SCIE PLAS, Anglie
- UV transluminátor In Genius, SynGene Imaging
- Běžné laboratorní sklo

#### 5.1.2 Chemikálie

- primery - Invitrogen, USA (Tab. 1., Tab. 2.)
- *Taq* DNA polymeráza - *Taq* DNA polymerase with ThermoPol Buffer, Bio-Labs, USA
- dNTP Mix - směs dATP, dTTP, dGTP, dCTP, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
- agaróza - Sea Kem LE Agarose, Lonza, USA
- etidiumbromid - Sigma Aldrich, Německo
- nanášecí pufr - TopBio, Česká republika
- TAE pufr (50x koncentrovaný)

- TRIZMA - Sigma Aldrich, Německo
- EDTA (0,5M roztok EDTA, pH 8,0) - Lachema, Česká republika
- Kyselina octová - Ing. Petr Lukeš, Česká republika
- 100 bp DNA marker - New England Biolabs, USA
- 180 µl vody
- 50 µl nanášecího pufu
- 20 µl DNA ladder
- 100 bp DNA marker - GeneRuler, Fermentas, Sample
- 180 µl vody
- 50 µl nanášecího pufu
- 20 µl DNA ladder

Použité primery jsou uvedeny v Tab. 1 a 2 a byly vybrány na základě literatury [11, 59, 64, 67]

Tab. 1. Použité primery 1. skupiny [59,64].

Název primeru	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost prod. (bp)
<i>iss</i> F	ATCACATAGGATTCTGCCG	<b>309</b>
<i>iss</i> R	CAGCGGAGTATAGATGCCA	
<i>papC</i> F	GACGAACCAACGGTCAGGAT	<b>501</b>
<i>papC</i> R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>neuC</i> F	GGTGGTACATTCCGGGATGTC	<b>670</b>
<i>neuC</i> R	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	
<i>iucD</i> F	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	<b>714</b>
<i>iucD</i> R	CCTGATCCAGATGATGCTC	
<i>tsh</i> F	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	<b>824</b>
<i>tsh</i> R	CTTCCGATGTTCTGAACGT	
<i>vat</i> F	TCCTGGGACATAATGGCTAG	<b>981</b>
<i>vat</i> R	GTGTCAGAACGGAATTGTC	

Tab. 2. Použité primery 2. skupiny [11, 67].

Název primeru	Sekvence primeru 5' - 3'	Velikost prod. (bp)
VT2 fp	TGTGGCTGGTTCGTTAATACGGC	
VT2 bp	TCCGTTGTTCATGGAAACCGTTGTC	102
VT1 fp	ACGTTACAGCGTGTTCRGGGATC	
VT1 bp	TTGCCACAGACTGCGTCAGTRAGG	121
ST I fp	TTCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG	
ST I bp	GGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG	160
LT I fp	TGGTTCATCATGCACCACAAGG	
LT I bp	CCATTTCTCTTTTGCCTGCCATC	360
ST II fp	CCCCCTCTCTTTTGCCTTCTTTCC	
ST II bp	TGCTCCAGCAGTACCATCTCTAACCC	423
CNF 1 fp	GGCGACAAATGCAGTTTGCTTGG	
CNF 1 bp	GACGTTGGTTGCGGTAATTTGGG	552
CNF 2 fp	GTGAGGCTCAACGAGATTATGCACTG	
CNF 2 bp	CCACGCTTCTTCTTCAGTTGTTCCCTC	839

### 5.1.3 Použité kmeny

Všech 45 kmenů *Escherichia coli* pocházelo ze sbírky mikroorganismů Ústavu technologie a mikrobiologie potravin Fakulty technologické UTB ve Zlíně a tyto byly uchovávány zamražené při teplotě -80 °C. Z této sbírky bylo použito v této práci 24 izolátů pocházejících z chlazené drůbeže a vepřového masa firmy RACIOLA - JEHLIČKA s.r.o., zlínská podniková prodejna, Řeznictví a uzenářství Josef Filák v podnikových prodejnách ve Zlíně a Uherském Hradišti. Jsou označeny R1-R8, R10, R15-R18, R20-R23, R25, R26, R31, R37-R40 [63]. Další 21 kmenů *E. coli* (Tab. 3) použitých v této práci bylo izolováno v rámci jiné diplomové práce v období listopad 2011 až únor 2012 z potravin zakoupených v obchodní síti ve Zlíně a blízkém okolí [66].

Tab. 3. Seznam použitých kmenů *Escherichia coli* [66].

Č. kmene	Původ	Taxon	Identifikace
4	vepřová plec	<i>Escherichia coli</i>	výborná
7	kuřecí křídla	<i>Escherichia coli</i>	přijatelná
10	kuřecí stehna	<i>Escherichia coli</i>	výborná
22	vepřová kýta	<i>Escherichia coli</i>	velmi dobrá
29	zkažený Eidam	<i>Escherichia coli</i>	druhová
32	Porubský mls	<i>Escherichia coli</i>	výborná
31	čerstvý bílý sýr	<i>Escherichia coli</i>	výborná
33	polotvrdý čerstvý sýr	<i>Escherichia coli</i>	velmi dobrá
34	čerstvý tvarohový sýr	<i>Escherichia coli</i>	velmi dobrá
37	sýrové nitě, paprikové	<i>Escherichia coli</i>	výborná
38	čerstvý sýr Billa	<i>Escherichia coli</i>	velmi dobrá
43	zákusek špička	<i>Escherichia coli</i>	druhová
44	ořechový rohlíček	<i>Eshcherichia coli</i>	druhová
49	zeleninový salát, Billa	<i>Escherichia coli</i>	druhová
61	laskonka	<i>Escherichia coli</i>	výborná
62	kuřecí křídla	<i>Escherichia coli</i>	výborná
63	zeleninový salát	<i>Escherichia coli</i>	druhová
64	ovčí sýr	<i>Escherichia coli</i>	přijatelná
74	kuře celé	<i>Escherichia coli</i>	druhová
75	kuřecí polévková směs	<i>Escherichia coli</i>	druhová
78	vepřová nožička	<i>Escherichia sp.</i>	druhová

## 5.2 Metody

### 5.2.1 Příprava vzorků DNA

Vzorek z misky byl rozpuštěn ve 100  $\mu\text{l}$  1x ředěného PCR pufru. Vzniklá suspenze byla inkubována v termobloku při 95 °C po dobu 20 minut. Pak byla provedena centrifugace 10 000 ot. po dobu 4 minut. Získaný supernatant obsahující DNA byl převeden do eppendorfky a použit jako templátová DNA pro PCR reakce.

### 5.2.2 Příprava vzorků pro PCR

Pro detekci faktorů virulence byla použita metoda PCR za použití uvedených primerů (Tab. 1 a 2). Komponenty pro prováděné reakce byly připraveny formou master mixu.

*Tab. 4. Složení amplifikační směsi pro jednoduchou reakci PCR*

*při použití primerů 1. skupiny.*

Složka PCR směsi	Objem ( $\mu\text{l}$ )
PCR pufr	2,5
dNTP mix	0,5
<i>Taq</i> DNA - polymeráza	0,1
primer F	0,25
primer R	0,25
templátová DNA	0,5
H <sub>2</sub> O	21

Tab. 5. Složení amplifikační směsi pro jednoduchou reakci PCR

při použití primerů 2. skupiny.

Složka PCR směsi	Objem (μl)
PCR pufr	2,4
dNTP mix	2
<i>Taq</i> DNA - polymeráza	0,16
primer F	0,2 – 0,5
primer R	0,2 – 0,5
templátová DNA	2
H <sub>2</sub> O	14,2

Tab. 6. Složení amplifikační směsi pro multiplex reakci PCR.

Složka PCR směsi	Objem (μl)
PCR pufr	2,5
dNTP mix	1
<i>Taq</i> DNA - polymeráza	0,5
MgCl <sub>2</sub>	2
primer F	0,1
primer R	0,1
templátová DNA	2
H <sub>2</sub> O	16

### 5.2.3 Amplifikace PCR

PCR reakce byly provedeny v termocycleru za těchto podmínek.

Tab. 7. Podmínky PCR reakce za použití primerů 1. skupiny.

<b>Úvodní denaturace</b>	<b>94 °C / 3min</b>
<b>Denaturace</b>	<b>94 °C / 30s</b>
<b>Annealing</b>	<b>58 °C / 30s</b>
<b>Extenze</b>	<b>68 °C / 3min</b>
<b>Závěrečná extenze</b>	<b>72 °C / 10min</b>
<b>Opakování cyklu</b>	<b>30x</b>
<b>chlazení</b>	<b>4 °C / ∞</b>

Tab. 8. Podmínky PCR reakce za použití primerů 2. skupiny.

<b>Úvodní denaturace</b>	<b>95 °C / 5min</b>
<b>Denaturace</b>	<b>95 °C / 30s</b>
<b>Annealing</b>	<b>63 °C / 1min</b>
<b>Extenze</b>	<b>68 °C / 3min</b>
<b>Závěrečná extenze</b>	<b>72 °C / 5min</b>
<b>Opakování cyklu</b>	<b>25x</b>
<b>chlazení</b>	<b>4 °C / ∞</b>

Tab. 9. Podmínky multiplex PCR.

<b>Úvodní denaturace</b>	<b>94 °C / 3min</b>
<b>Denaturace</b>	<b>94 °C / 30s</b>
<b>Annealing</b>	<b>58 °C / 30s</b>
<b>Extenze</b>	<b>68 °C / 3min</b>
<b>Závěrečná extenze</b>	<b>72 °C / 10min</b>
<b>Opakování cyklu</b>	<b>30x</b>
<b>chlazení</b>	<b>4 °C / ∞</b>

#### 5.2.4 Detekce PCR produktů

Produkty vzniklé PCR reakcí byly detekovány pomocí elektroforézy v 1,5% agarosovém gelu. Pro přípravu gelu bylo naváženo 1,5 g agarosy a zalito 100 ml 1x TAE pufrem, který byl naředěn ze zásobního 50x koncentrovaného roztoku TAE. Vzniklá směs byla za občasného míchání rozpouštěna v mikrovlnné troubě. Takto připravený roztok agarosy byl samovolně zchlazen. K roztoku byly přidány 4 $\mu$ l etidiumbromidu a roztok byl nalit do připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem. Po ztuhnutí byl gel zalit 1x TAE pufrem a po vyjmutí hřebínku byly do gelu nanášeny vzorky DNA v objemu 12  $\mu$ l roztoku, tvořeného 2  $\mu$ l nanášecího pufru a 10  $\mu$ l PCR produktu. Do první a poslední jamky byl nanesen v objemu 10  $\mu$ l jako standard ukazatel 100 bp marker. Elektroforetická separace proběhla za stálého napětí 90 V, cca 50 minut. Časový úsek, po který DNA migrovala, byl závislý na velikosti separovaných fragmentů. Separace probíhala tak dlouho, dokud bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru nedoputovala asi do 2/3 gelu. Po ukončení elektroforézy byla DNA posouzena v UV světle pomocí UV transluminátoru a výsledek zdokumentován pomocí programu Gene - Snap od SyneGene.



## 6 VÝSLEDKY

Přítomnost *E. coli* je ukazatelem fekálního znečištění potravin a pitné vody [1]. V diagnostice mikrobiologických patogenů je jednou z nejčastěji používaných metod PCR. Považuje se za standardní metodu detekce některých nekultivovatelných nebo obtížně kultivovatelných patogenů [47]. *E. coli* je nositelem několika typů faktorů virulence. Četné faktory virulence jako adhesiny, invasiny, toxiny a sekreční systémy se zapojují do mechanismů patogenity *Escherichia coli*. Kmeny téhož patotypu bývají geneticky podobné a disponují podobnými faktory virulence, které slouží k určení patogenního potenciálu daného kmenu *E. coli* [7,47]. Kmeny použité pro detekci faktorů virulence byly izolovány z potravin dostupných v obchodní síti ve Zlínském kraji (Tab. 3).

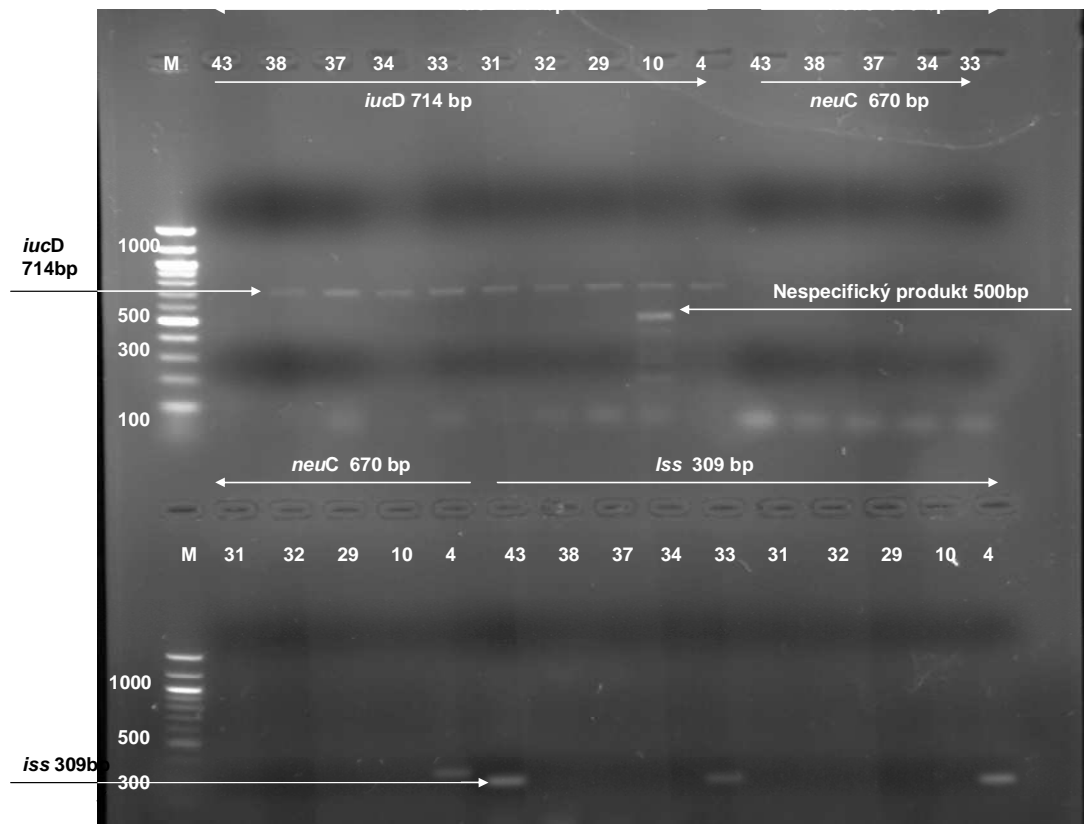
### 6.1 Detekce faktorů virulence *iss*, *iucD*, *neuC*, *papC*, *tsh*, *vat*

Jednoduchými reakcemi PCR bylo prověřeno 45 kmenů. Nejdříve byly provedeny reakce s první sadou primerů (Tab. 1). Byla zjišťována možná přítomnost genů pro adhesiny - *papC*, proteiny vnější membrány-*neuC*, sérovou bílkovinu přežití-*iss*, aerobaktin-*iucD*, termolabilní hemaglutin-*tsh* a *vat*-autotransportní toxin, což je protein z 75% homologní s termolabilním hemaglutinem [50]. V různých studiích tyto faktory virulence byly zjištěny převážně u kmenů APEC. Podle studií mechanismů virulence u aviární patogenní *E. coli* (APEC) jsou tyto mechanismy považovány za multifaktoriální.

Z mnoha studií bylo zjištěno, že velký význam mají hlavně faktory virulence, jako jsou adhesiny, produkce kolicinů, aerobaktin, přítomnost sérového proteinu, termolabilní hemaglutin a přítomnost určitých kapsulárních antigenů [59,60]. APEC kmeny jsou zodpovědné za ptačí kolibacilózy v domácích chovech a u volně žijících ptáků. Kolibacilóza je nemoc, která začíná jako zánět dýchacích cest a vyvíjí se do systémové infekce vnitřních orgánů. Kmeny APEC vykazují podobnost s lidskými ExPEC kmeny, ale nebylo zatím zcela objasněno, zda odlišné ExPEC kmeny jsou spojeny s výskytem těchto invazivních onemocnění u člověka a zvířat, nebo zda konkrétní klony jsou spojeny s ptačí kolibacilózou a uroseptickou infekcí nebo meningitidou [59,60].

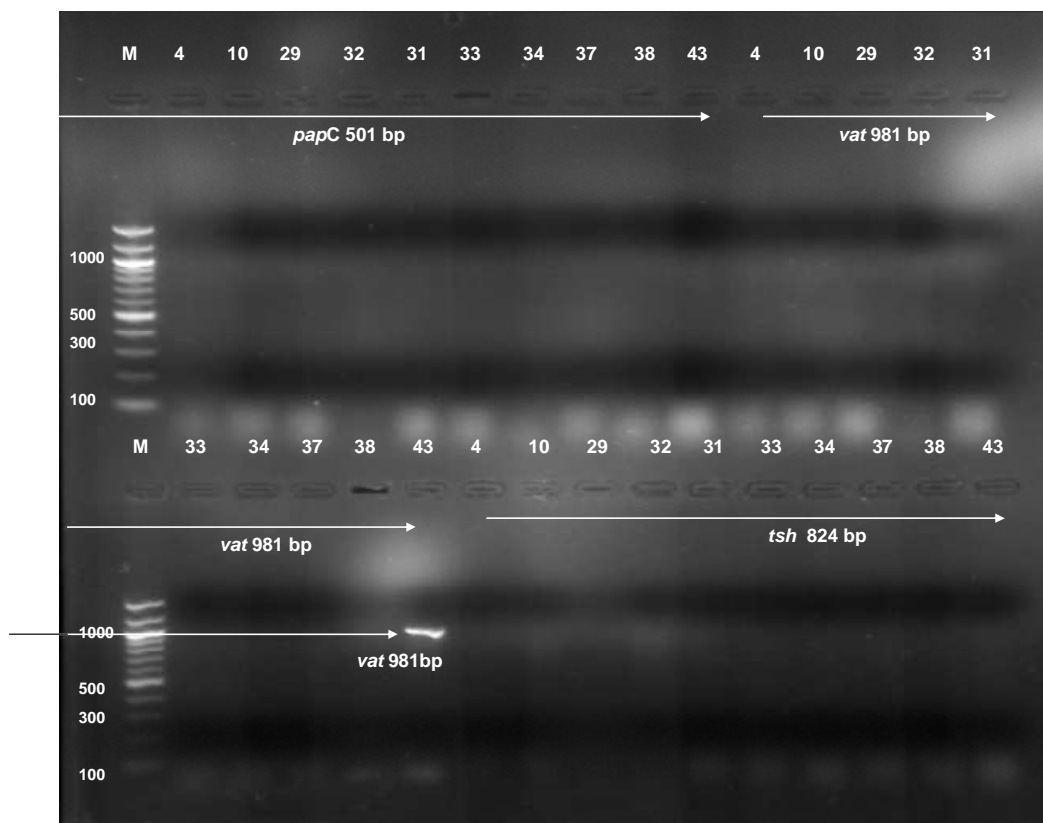
V této práci u každého kmenu byly provedeny jednotlivé reakce k detekci vybraných faktorů virulence s použitím uvedených primerů. Komponenty pro provádění reakce byly připraveny ve formě mastermixu (Tab. 4). Velikost produktů u použitých primerů je uvedena

v Tab. 1. Pro amplifikaci byly nastaveny podmínky uvedené v Tab. 7. Poté byla provedena kontrola přítomnosti specifických PCR produktů pomocí agarózové elektroforézy.



Obr. 3. Výsledky jednoduchých PCR reakcí, detekce genu *iss*, *iucD* a *neuC*.

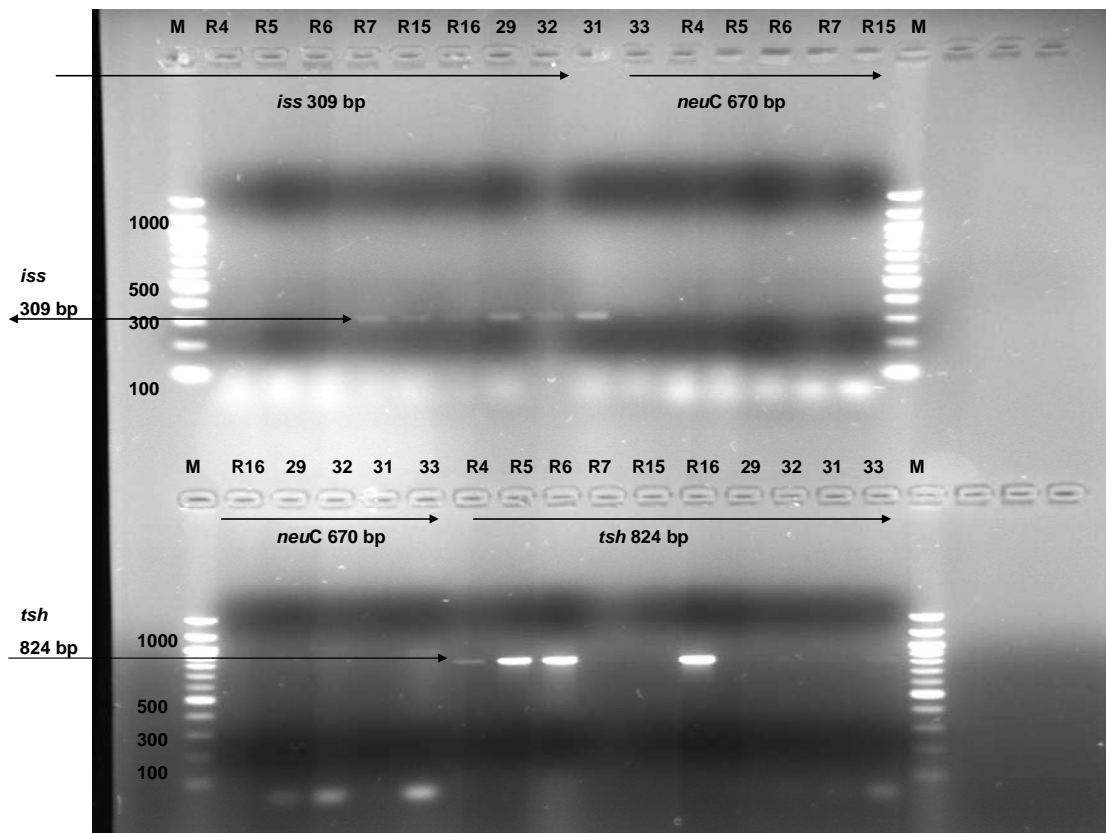
Na Obr. 3 jsou patrné výsledky jednotlivých reakcí PCR u jedné skupiny kmenů. Pro průkaz faktorů virulence byly použity primery *iucD*, *neuC* a *iss*. Přítomnost genu pro aerobaktin *iucD* 714 bp, je patrná u 9 kmenů z 10 testovaných. Gen *iucD* pro aerobaktin je kódován na plasmidu ColV-K30, skládá se z pěti genů *iucA*, *iucB*, *iucC* a *iucD*, tyto se účastní biosyntézy aerobaktinu a *iutA*, který kóduje membránový receptor pro železo [62]. Kmeny, které vykazují přítomnost genu *iucD* byly izolovány z cukrářských výrobků, sýrů a kuřecího masa (Tab. 3). Přítomnost genu *neuC* o velikosti 670 bp nebyla zaznamenána u žádného kmene. Přítomnost genu *iss*, o velikosti 309 bp byla zaznamenána u 3 kmenů v této sérii reakcí. Kmeny, které vykazují přítomnost genu *iss*, byly izolovány z cukrářského výrobku, sýru a kuřecího masa (Tab. 3). U kmene č.10 byly identifikovány nespecifické produkty o velikost asi 500 bp a 400 bp. Výskyt těchto produktů mohl být způsoben nedodržením postupu při přípravě vzorku pro PCR reakci, nebo kontaminací z vnějšího prostředí.



Obr. 4. Výsledky jednoduchých PCR reakcí, detekce genu *papC*, *vat*, *tsh*.

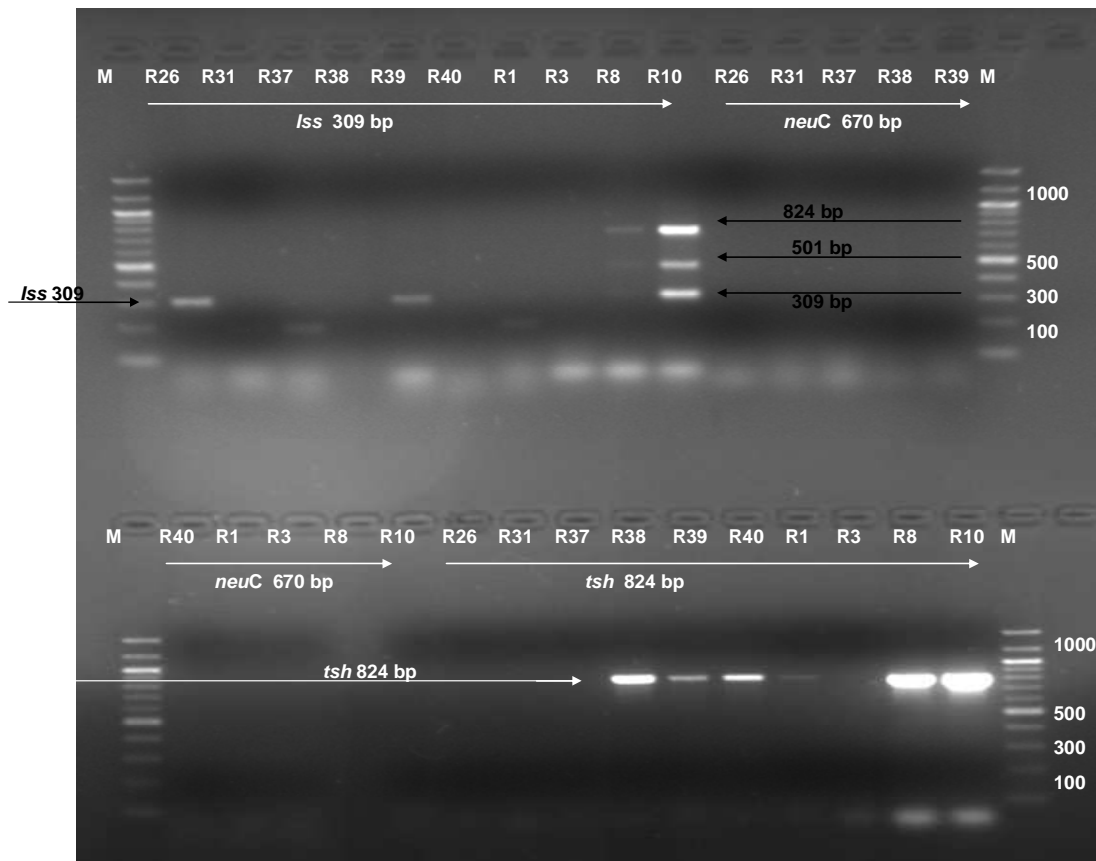
V další sérii pokusů byly použity primery k detekci genu *papC*, *vat* a *tsh*. Byla použita stejná sada kmenů. Z 10 testovaných kmenů byla prokázána přítomnost (Obr. 4) pouze jednoho genu, a to genu *vat* u kmene č. 43, který byl izolován z kuřecího masa (Tab. 3). U ostatních kmenů nebyla prokázána přítomnost žádného genu, dokazující možný faktor virulence. Gen *papC* je specifický pro určení adhesinů. Přítomnost těchto genů byla prokázána u kmenů *E. coli* způsobující infekce močových cest. Jsou známé pod označením *papC*, *papG* [2,13]. Další typy adhesinů P-fimbrií byly detekovány i u kmenů způsobující septikémie drůbeže a prasat [49,56]. Fimbriální adhesiny byly poprvé popsány u uropatogenních kmenů *E. coli*. Latham a Stamm ve své práci v roce 1994 uvádějí, že gen pro P-fimbrii je kódován na *PAP* operonu a umístěn na chromozomu [57]. V důsledku negativního výsledku se dá spekulovat, že námi testované kmeny nemusí patřit ke skupinám kmenů *E. coli*, které mohou způsobovat již zmíněné onemocnění. Gen *vat* určuje přítomnost autotrasportního toxinu. V našem případě byl detekován pouze u kmene č. 43. V práci Ch. Ewerse a kol. z roku 2005 [59] bylo testováno celkem 40 kmenů *E. coli* a přítomnost genu *vat* vykazovalo 14 kmenů. Tyto kmeny byly zařazeny do skupin UPEC a APEC [59]. Na základě našeho výsledku, kdy přítomnost genu *vat* byla prokázána u jednoho kmene, můžeme předpoklá-

dat, že kmen č. 43, který byl izolován z kuřecího masa, by mohl patřit do skupiny aviárních patogenních *E. coli*.



Obr. 5. Výsledky jednoduchých PCR reakcí, detekce genu *iss*, *neuC*, *tsh* 1.

Z Obr. 5 je patrná přítomnost genu *iss* a *tsh*. U jednoho z 10 testovaných kmenů, u kmene č. R16 byla zaznamenána přítomnost jak genu *iss*, tak genu *tsh*. Tento kmen byl izolován z drůbežího masa [63]. U kmene č. 33, který byl izolován z polotvrdého sýru je zřetelná přítomnost genu *iss* a velmi slabě patrná přítomnost genu *tsh*. Přítomnost genů *iss* a *tsh* bývá přisuzována kmenům aviárním patogenním (APEC), které se řadí do fylogenetické skupiny B [64]. Gen *neuC* o velikosti 670 bp nebyl prokázán ani v této sérii pokusů u žádného kmenu.



Obr. 6. Výsledky jednoduchých PCR reakcí, detekce genu *iss*, *neuC* a *tsh* 2.

U tohoto pokusu byla zjištěna přítomnost genu *iss* u tří kmenů, R10, R26 a R39 (Obr. 6). Tyto kmény pochází z kuřecího masa. U kmenu R10 byly dále detekovány nespecifické produkty o velikosti asi 501 bp a asi 824 bp. Těmito velikostem by mohly odpovídat geny *papC* o velikosti 501 bp a *tsh* o velikosti 824 bp. Výskyt těchto nespecifických produktů lze vysvětlit nejspíše kontaminací z vnějšího prostředí nebo nedodržením správného postupu při přípravě mastermixu pro jednoduché PCR reakce. U kmenů R1 a R37 jsou z Obr. 6. patrné další nespecifické produkty o velikosti asi 200 bp, výskyt těchto produktů lze také vysvětlit nejspíše nedodržením postupu při přípravě mastermixu pro PCR reakce nebo kontaminací jiným primerem.

Tab. 10. Výskyt sledovaných faktorů virulence u kmenů izolovaných z potravin.

Kmen č.	<i>iss</i>	<i>papC</i>	<i>neuC</i>	<i>iucD</i>	<i>tsh</i>	<i>vat</i>
4	+	-	-	+	+	-
7	-	-	-	-	-	-
10	-	+	-	+	-	-
22	-	-	-	-	-	-

<b>29</b>	+	-	-	+	-	-
<b>32</b>	+	-	-	+	-	-
<b>31</b>	-	-	-	+	-	-
<b>33</b>	-	-	-	+	-	-
<b>34</b>	-	-	-	+	-	-
<b>37</b>	-	-	-	+	-	-
<b>38</b>	-	-	-	+	-	-
<b>43</b>	+	-	-	-	-	+
<b>44</b>	-	-	-	-	-	-
<b>49</b>	-	-	-	-	-	-
<b>61</b>	-	-	-	-	-	-
<b>62</b>	-	-	-	-	+	-
<b>63</b>	-	-	-	-	-	-
<b>64</b>	-	-	-	-	-	-
<b>74</b>	-	-	-	-	-	-
<b>75</b>	-	-	-	-	-	-
<b>78</b>	-	-	-	-	-	-
<b>R1</b>	-	-	-	+	+	-
<b>R2</b>	-	-	-	-	-	-
<b>R3</b>	-	-	-	+	-	-
<b>R4</b>	+	-	-	+	+	-
<b>R5</b>	+	+	-	+	+	-
<b>R6</b>	+	+	-	+	+	-
<b>R7</b>	+	-	-	-	-	-
<b>R8</b>	-	-	-	+	+	-
<b>R10</b>	-	-	-	+	+	-
<b>R15</b>	+	-	-	+	-	-
<b>R16</b>	+	-	-	+	+	-
<b>R17</b>	+	-	-	-	-	-
<b>R18</b>	+	-	-	-	-	-
<b>R20</b>	+	-	-	-	-	-
<b>R21</b>	+	-	-	-	-	-
<b>R22</b>	+	-	-	-	-	-
<b>R23</b>	-	-	-	-	-	-
<b>R25</b>	+	-	-	-	-	-
<b>R26</b>	+	-	-	+	-	-
<b>R31</b>	-	-	-	-	-	-
<b>R37</b>	-	-	-	-	-	-
<b>R38</b>	+	-	-	-	+	-
<b>R39</b>	-	-	-	-	+	-
<b>R40</b>	-	-	-	-	+	-

V Tab. 10 je uveden přehledně výskyt sledovaných faktorů virulence u jednotlivých kmenů. Výsledky byly zapsány na základě provedených jednoduchých reakcí PCR u všech kmenů. Přítomnost genu *iss* byla prokázána u 18 kmenů, přítomnost genu *papC* byla prokázána u 3 kmenů, gen *neuC* nebyl zaznamenán u žádného kmene. Zatímco výskyt genu *iucD* byl prokázán u 19 kmenů a gen *tsh* u 21 kmenů. Přítomnost genu *vat* byla zaznamenána pouze u jediného kmene. U 12 testovaných kmenů nebyla zaznamenána přítomnost žádného genu prokazujícího faktor virulence. U 10 kmenů byla detekována přítomnost dvou genů pro určitý faktor virulence, u 3 kmenů se projevíly tři faktory a u dvou kmenů byla prokázána přítomnost čtyř faktorů virulence. Jednalo se o kmeny pocházející ze bírky mikroorganismů ÚTMP Fakulty technologické UTB ve Zlíně izolované z chlazené drůbeže a vepřového masa firmy RACIOLA - JEHLIČKA s.r.o., zlínská podniková prodejna, Řeznictví a uzenářství Josef Filák v podnikových prodejnách ve Zlíně a Uherském Hradišti.

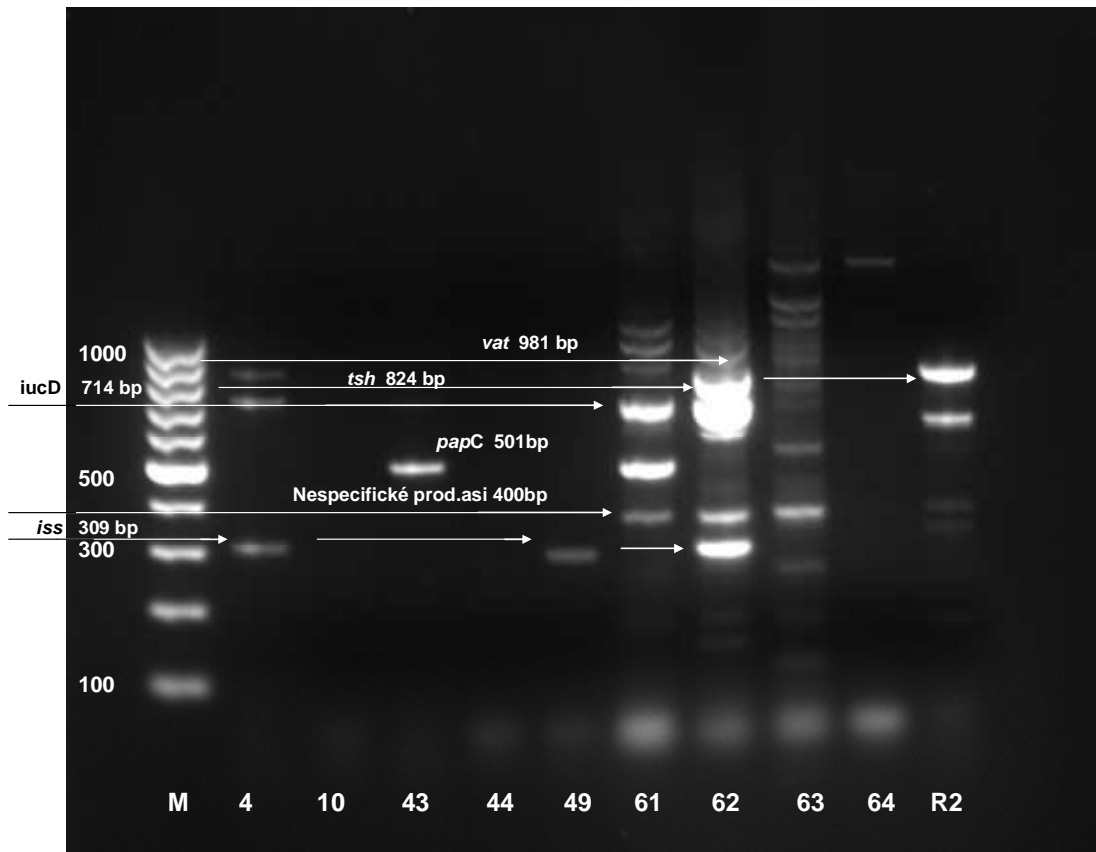
### 6.1.1 Multiplex PCR

Metoda multiplex PCR je varianta PCR, kdy je do reakční směsi přidáno několik párů primerů, které dávají odlišné velikosti jednotlivých PCR produktů. Toto umožňuje detekci několika genů současně v jedné reakční směsi. Je také nutné, aby annealingové teploty všech použitých primerů byly stejné nebo alespoň podobné. Hlavní výhody metody multiplex PCR je určitě zkrácení času pro přípravu PCR mixu a také ušetření nákladů na reakční komponenty. Multiplex PCR se proto využívá při hledání změn na poměrně dlouhých úsecích DNA, při testování vzájemně nesouvisejících oblastí DNA a zejména pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky [31,35].

V této práci byly navíc do reakční směsi pro multiplex PCR přidány hořčíkové ionty  $MgCl_2$  v množství 2  $\mu l$  (Tab. 6). Hořčíkové ionty slouží k zesílení vazby primerů dosedajících na templátovou DNA. Pro průběh byly nastaveny podmínky uvedené v Tab. 9. Při nastavení optimálních podmínek bylo čerpáno z práce Ch. Ewerse z roku 2005 [59], kde k detekci faktorů virulence u kmenů *E. coli* bylo použito stejných primerů.

U vybraných kmenů byla metodou multiplex PCR prokázána přítomnost některých faktorů virulence (Obr. 7). U kmenu č. 4 byl detekován gen *iss* o velikosti 309 bp, velmi slabě byl prokázán gen *iucD* a *tsh*. U kmenu č. 10 není patrná přítomnost žádného ze sledovaných genů. U kmenu č. 43 byl detekován gen *papC* o velikosti 501 bp. Kmen č. 44 nevykazuje přítomnost žádného genu. U kmenu č. 49 je málo výrazný PCR produkt pro *iss*. U kmenu

č. 61 je velmi výrazná přítomnost genu *papC* a *iucD* a *vat*, je zde patrný výskyt nespecifických produktů o velikosti asi 400 bp. Tyto nespecifické produkty se vyskytují i u kmenů č. 62 a č. 63, u těchto kmenů se také vyskytují nespecifické produkty o podobné velikosti 981 bp jako *vat*.



Obr. č. 7. Výsledky multiplex PCR u vybraných kmenů.

U kmenu č. 63 je také slabě patrný výskyt nespecifického produktu o velikosti asi 600bp, což by mohl být i *papC*, vzniklý nedokonalým navázáním primeru na templátovou DNA. Kmen č R2 vykazuje přítomnost genu *iucD* a *tsh*. Přítomnost genů, které nebyly detekovány při jednotlivých reakcích (Tab. 10) lze vysvětlit přidáním  $MgCl_2$  nebo nastavením jiných podmínek pro průběh reakce. Výskyt nespecifických produktů patrných na Obr. 7 lze vysvětlit slabým navázáním primeru na templátovou DNA, možnou kontaminací z vnějšího prostředí nebo nedodržením postupu při přípravě reakční směsi.



## 6.2 Detekce faktorů virulence *cnf1*, *cnf2*, *LTI*, *STI*, *STII*, *VT1*, *VT2*

Pro jednoduché reakce PCR pro detekci faktorů virulence za použití 2. skupiny primerů byly vybrány na základě dosažených výsledků kmeny č. 4, č. 10 a č. 43. U kmenu č. 4 byla prokázána přítomnost genu *iss*, *iucD* a *tsh*. Tento kmen byl izolován z vepřového masa. U kmenu č. 10, který byl izolován z kuřecího masa, byla prokázána přítomnost genu *papC* a *iucD*. U kmenu č. 43 byla zaznamenána přítomnost genu *iss* a jako u jediného kmenu i přítomnost genu *vat*. Tento kmen byl izolován ze zákusku [66]. Kmen č. 10 na základě fylogenetické analýzy byl zařazen do fylogenetické skupiny B2 [66]. Tato skupina zahrnuje takové kmeny *E. coli*, které způsobují intestinální a extraintestinální infekce [17].

U těchto vybraných kmenů byly provedeny jednoduché reakce PCR na přítomnost faktorů virulence-*cnf1*, *cnf2*, *LTI*, *STI*, *STII*, *VT1* a *VT2*. *Cnf1* a *cnf2* představují geny pro cytotoxický nekrotizující faktor, tento faktor se vyskytuje převážně u kmenů uropatogenních (UPEC). Kmeny způsobující uroseptické infekce se řadí do fylogenetické skupiny B<sub>2</sub> a D [42,61]. Produkce verotoxinů je považována za hlavní faktor virulence u kmenů VTEC – verotoxigenních. Verotoxin VT1 je až z 99% vysoce homologní s shigelovým toxinem, který produkuje bakterie *Shigella dysenteriae*. Gen *STI* a *STII* slouží k detekci teplotně stabilního enterotoxinu, který se vyznačuje nízkou molekulovou hmotností [56], zatímco *LTI* značí přítomnost teplotně labilního enterotoxinu [11]. Zatímco verotoxin *VT2* je mnohem více heterologní, s *VT1* je identický jen z 55 %. [11,67].

Komponenty pro prováděné reakce byly připraveny ve formě mastermixu (Tab. 5). Velikost produktů u použitých primerů je uvedena v Tab. 2. Pro amplifikaci byly nastaveny podmínky uváděné v Tab. 8. Poté byla provedena kontrola přítomnosti specifických PCR produktů pomocí agarózové elektroforézy.

U žádného z vybraných kmenů nebyla prokázána přítomnost faktoru virulence podle použitých specifických primerů (Tab. 11). V práci Holko a kol. bylo použito do reakční směsi PCR i  $MgCl_2$  a annealingová teplota byla nastavena na 63 °C [11]. V této práci do reakční směsi nebyly přidány  $MgCl_2$  a teplota annealingu byla nastavena také na 63 °C. Dá se spekulovat, že vybrané kmeny mohou nebo nemusí patřit do skupiny toxigenních *E. coli*, přestože kmen č. 10 byl na základě fylogenetické analýzy zařazen do skupiny B2 [66], která tyto nebezpečné kmeny zahrnuje.

*Tab. 11. Výskyt dalších faktorů virulence u 3 kmenů izolovaných z potravin.*

<b>Kmen č.</b>	<b>VT1</b>	<b>VT2</b>	<b>CNF1</b>	<b>CNF2</b>	<b>LT I</b>	<b>ST I</b>	<b>ST II</b>
<b>4</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>10</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>43</b>	-	-	-	-	-	-	-

## 7 DISKUZE

### 7.1 *iss*

Gen *iss* kóduje sérovou bílkovinu přežití, což je ochranná látka pro přežití buňky, která se dostala do krevního řečiště hostitele. Gen *iss*, jako faktor virulence je identifikován jako rozlišovací znak kmenů ExPEC. Je kódován na plazmidu ColV a chromozomech. Tento faktor virulence byl zjištěn i u kmenů i u ptačích *E. coli* (APEC) a u kmenů způsobujících novorozenecké meningitidy [68].

V této práci byl gen *iss* detekován u 18 kmenů ze 45. Některé z těchto kmenů, kde byl detekován *iss*, vykazovaly přítomnost i jiných faktorů virulence. Celkem 9 kmenů vykazovalo přítomnost *iss* a *iucD*, který detekuje aerobactin, který patří mezi hlavní faktory virulence aviárních patogenních kmenů [62]. Celkem 6 kmenů bylo izolováno z kuřecího, 1 kmen byl izolován z vepřového masa a 2 kmeny byly izolovány z mléčných výrobků. Dá se tedy předpokládat, že kmeny, které vykazují přítomnost obou faktorů virulence, by mohly náležet k aviárně patogenním *E. coli* (APEC).

### 7.2 *papC*

Gen *papC* – náleží do skupiny genů pro určení fimbriálních adhesinů. Vlastní adherenci způsobuje receptor, který se nachází na konci fimbrií (Kapitola 2.1.1.) a je schopen specificky reagovat s buňkami epitelie [15]. Fimbrie jsou velmi křehké, bakterie je tedy snadno ztrácí, a proto si musí neustále vytvářet nové. Neustálá výměna fimbrií je vlastním faktorem virulence, dochází při ní ke změně antigenního složení pilinu a bakterie tím získávají obranu proti působení slizničních protilátek. Kmeny *E. coli* způsobující infekce močových cest jsou vybaveny fimbriemi nazývanými jako P-fimbrie, kódované geny *papC*, *papG* [2,13]. Fimbriální adhesiny byly poprvé popsány u uropatogenních kmenů *E. coli* [57].

Z výsledků v této práci je patrné, že gen *papC*, který se vyskytuje převážně u uropatogenních kmenů *E. coli*, byl detekován u 3 kmenů ze 45. Tyto kmeny pocházely z drůbežího masa, zakoupeného v obchodní síti Zlínského kraje. Ve studii A. Mory [64] bylo testováno celkem 59 kmenů, které pocházely z ptačích kolibacilóz (APEC) a lidských meningitid a infekcí močových cest (ExPEC). Přestože, podle fylogenetických analýz jsou tyto kmeny

řazeny k jiným skupinám, byla zde určitá podobnost ve výskytu faktorů virulence. Jak lidské ExPEC, tak ptačí APEC vykazovaly přítomnost *iss* i *papC*.

### 7.3 *neuC*

Gen *neuC* - je součástí 17-kb klastru genů KPS, tento klastr kóduje biosyntézu a transport pouzdra. Gen *neuC* kóduje protein vnější membrány, který je potřebný pro syntézu kyseliny sialové [51]. Bývá uváděn jako faktor virulence u kmenů ExPEC [69].

V této práci přítomnost genu *neuC* nebyla zaznamenána u žádného kmene. Negativní výsledek lze vysvětlit tím, že žádný ze souboru kmenů použitých v práci nespadal do skupiny, u které se tento faktor virulence vyskytuje, ale je také možné, že negativní výsledek byl způsoben nedodržením postupu při přípravě reakční směsi, nebo použitím jednoho či více nedostatečných komponentů.

### 7.4 *iucD*

Gen *iucD* – detekuje aerobaktin. Je to protein, který se nachází na plazmidu ColV-K30. Skládá se z pěti genů *iucABCD*, tyto se účastní biosyntézy aerobaktinu a *iutA*, který kóduje vnější membránový receptor pro železo, ferriaerobaktin [62,65].

V Tab.10 je zaznamenána přítomnost tohoto genu u 19 kmenů ze 45 testovaných. V několika případech zde došlo ke kombinaci různých genů. Nejčastější výskyt je *iss* a *iucD*, tato kombinace se vyskytuje u 9 kmenů, u 2 kmenů se vyskytuje kombinace s *tsh*. U 2 kmenů je dokonce kombinace čtyř faktorů, a to *iss*, *papC*, *iucD* a *tsh*. Jedná se o kmeny R5 a R6, které byly izolovány z kuřecího masa.

Na základě různých studií o výskytu faktorů virulence spojených s aviárně patogenními kmeny *Escherichia coli* (APEC) byla v práci Ch. Ewerse [59] popsána metoda multiplex PCR jako molekulární nástroj, který doplnil stávající diagnostické systémy. Bylo testováno 40 kmenů *E. coli* z APEC, EHEC, EPEC, ETEC, UPEC. Ve výsledcích jsou patrné různé kombinace genů u jednotlivých kmenů. Např. u UPEC se vyskytly kombinace genů *iss*, *papC* a *iucD* a *vat* [59].

## 7.5 *tsh*

Gen *tsh* – je gen určující jako faktor virulence termolabilní hemaglutin, je to protein, který patří do skupiny autotransportních proteinů. Tyto proteiny mají různé funkce, které jsou spojeny s virulencí. Podílí se na např. na adherenci, na produkci cytotoxinů. Tsh byl poprvé zjištěn u ptačí *E. coli* (APEC) u kmene  $\chi 7122$  [70]. Protein kódovaný genem *tsh* vykazuje 50% podobnost s imunoglobulinem IgA u *Neisseria gonorrhoeae* a *Haemophilus influenzae* [59,60].

Ve výsledcích (Tab. 10) byl tento gen přítomen u 12 kmenů. U 2 kmenů se vyskytla kombinace genů *iucD* a *tsh*, u 1 kmene kombinace *iss* a *tsh*, u 3 kmenů kombinace *iss*, *iucD* a *tsh* a u jednoho kmene se vyskytla kombinace *iss*, *papC*, *iucD* a *tsh*. Všechny tyto kmeny byly izolovány z kuřecího masa a vepřového masa, zakoupeného v obchodní síti ve Zlínském kraji.

Ve studii A. Mory [64] jsou také popsány různé kombinace genů u testovaných kmenů. Testované kmeny patří do APEC a ExPEC [64]. Také v práci A. Rochoy [60] byl zaznamenán výskyt různých kombinací genů u testovaných kmenů. Testované kmeny náležely do skupiny ptačích *E. coli* (APEC) [60].

## 7.6 *vat*

Gen *vat* – je autotransportní toxin, protein z 75% homologní s termolabilním hemaglutinem [50]. Je kódován na ostrově patogenity (PAI). Studie Kwona z roku 2008 [52] byla zaměřena na detekci 8 faktorů virulence metodou multiplex PCR u kmenů APEC izolovaných z kuřat. Velká pozornost zde byla věnována genu *vat*. Cytotoxická látka u kmenů APEC, označená jako *vat* má podobné účinky jako cytotoxický efekt *Helicobacter pylori* [52]. Ačkoliv přesná funkce nebyla objasněna, dá se spekulovat, že *vat* může fungovat jako důležitý faktor virulence. V této práci byl gen *vat* detekován pouze u jediného kmene u jednoduchých PCR reakcí, a to u kmene č. 43 (Tab. 10), který byl izolován z cukrářského výrobku. Při multiplex PCR (Obr. 7) byl gen *vat* detekován také u kmenu č. 62, který byl izolován z kuřecího masa. U kmenů č. 61 a č. 63 byla patrná přítomnost nespecifických produktů o velikosti kolem 970 bp.

## 7.7 Multiplex PCR

Metoda multiplex PCR je varianta PCR, která umožňuje detekci několika genů současně v jedné reakční směsi. Hlavní výhody metody multiplex PCR je určitě zkrácení času pro přípravu PCR mixu a také ušetření nákladů na reakční komponenty. Multiplex PCR se proto využívá při hledání změn na poměrně dlouhých úsecích DNA, při testování vzájemně nesouvisejících oblastí DNA a zejména pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky [31,35].

V této práci byla u vybraných kmenů metodou multiplex PCR prokázána přítomnost některých faktorů virulence (Obr. 7). Kmeny byly vybrány na základě výsledků z jednoduchých PCR reakcí. Kmen č. 4 vykazoval kombinaci genů *iss*, *iucD* a *tsh*, kmen č. 10 vykazoval kombinaci genů *papC* a *iucD*, kmen č. 43 kombinaci genů *iss* a *vat*. Kmeny č. 44, 49, 61 nevykazovaly při jednoduchých PCR reakcích přítomnost žádného genu. U kmenu č. 62 byl detekován gen *tsh* (Tab. 10). U kmenu č. 4 byl detekován gen *iss* o velikosti 309 bp., velmi slabě byl prokázán gen *iucD* a *tsh*. Tyto geny byly prokázány i u jednoduchých PCR reakcí. U kmenu č. 10 není patrná přítomnost žádného genu, zatímco u jednoduchých PCR reakcí byl pozitivní *papC* a *iucD*. U kmenu č. 43 byl detekován gen *papC* o velikosti 501 bp, který se ve výsledcích jednoduchých reakcí neprojevil. Při jednoduchých PCR reakcích byla u tohoto kmenu zaznamenána přítomnost genů *iss* a *vat*. Kmen č. 44 nevykazuje přítomnost žádného genu. U kmenu č. 49 je málo výrazná přítomnost *iss*. Při jednoduchých PCR reakcích tyto kmeny nevykazovaly přítomnost žádného genu (Tab. 10). U kmenu č. 61 je velmi výrazná přítomnost genu *papC* a *iucD* a *vat*, je zde patrný výskyt nespecifických produktů o velikost asi 400 bp. Tyto nespecifické produkty se vyskytují i u kmenů č. 62 a č. 63. U kmenu č. 63 je také slabě patrný výskyt nespecifického produktu o velikosti asi 600 bp, což by mohl být i *papC*, vzniklý nedokonalým navázáním primeru na templátovou DNA. Při jednoduchých PCR reakcích kmeny č. 61 a č. 63 nevykazovaly přítomnost žádného faktoru virulence a u kmene č. 62 byla zaznamenána přítomnost *tsh* (Tab. 10). Kmen č. R2 vykazuje přítomnost genu *iucD* a *tsh*, při jednoduchých PCR reakcích nevykazoval přítomnost žádného genu. Přítomnost genů, které nebyly detekovány při jednoduchých PCR reakcích lze vysvětlit přidáním  $MgCl_2$  nebo nastavením jiných podmínek pro průběh reakce.

## 7.8 Produkce toxinů jako faktor virulence

Produkce toxinů je velmi důležitá částí virulence a patogenity mikroorganismů. Enterotoxigenní kmeny *E. coli* mohou produkovat dva typy enterotoxinů, termolabilní enterotoxin, označený jako LT a termostabilní enterotoxin, označený jako STI, STII [11,17]. Tepelně labilní toxin LT je kódován na plazmidu a skládá se ze dvou podjednotek [56].

U kmenů STEC je hlavním faktorem virulence produkce Shiga - toxinů Stx1 a Stx2. Patogenní účinek Shiga toxinů spočívá v inhibici proteosyntézy, která má za následek smrt buňky. Patří tedy do skupiny toxinů brzdící syntézu bílkovin [27].

U kmenů VTEC-verotoxigenních je za hlavní faktor virulence považována produkce verotoxinů VT1 a VT2. Verotoxin VT1 je až z 99 % vysoce homologní s shigelovým toxinem, který produkují kmeny *Shigella dysenteriae*. Zatímco verotoxin VT2 je mnohem více heterologní, s VT1 je identický jen z 55 %. Některé kmeny *E. coli* produkují protein *cnf1* a *cnf2*, který představuje gen pro cytotoxický nekrotizující faktor, tento faktor se vyskytuje převážně u kmenů uropatogenních (UPEC). Kmeny způsobující uroseptické infekce se řadí do fylogenetické skupiny B<sub>2</sub> a D [46,71].

V této práci byly na přítomnost genů pro produkci toxinů testovány 3 kmeny (Kapitola 6.2.). Z výsledků (Tab. 11.) je zřejmé, že nebyla potvrzena přítomnost hledaných faktorů virulence u žádného z testovaných kmenů. Ve studii M. A. Passe a kol. [67] ze vzorků byly postupně izolovány různé varianty VT2, VT2c, VT2d, VT2e, VT2f. Pomocí PCR byla identifikována *E. coli* produkující novou variantu VT2, a to VT2g. Produkce verotoxinu VT2g byla zjištěna pouze u bovinních kmenů, u humánních kmenů *E. coli* nebyla potvrzena [67].

## ZÁVĚR

Bakterie *Escherichia coli* je fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinkovitá bakterie, běžně se vyskytující v intestinálním traktu člověka a teplokrevných živočichů. *E. coli* se řadí mezi podmíněně patogenní mikroorganismy a může vyvolávat různé typy infekcí. Její přítomnost ve vodě nebo v potravinách je ukazatelem fekálního znečištění. Mimo střevo je *E. coli* téměř vždy patogenní. V intestinálním traktu je patogenita možná v případě, že je kmen vybaven specifickými faktory virulence. Patogenita je schopnost daného mikroorganismu vyvolávat onemocnění u konkrétního hostitele. Virulence je míra patogenity a je dána počtem faktorů virulence. Mezi základní principy virulence se řadí invazivita, přenosnost a produkce toxinů.

K detekci mikroorganismů se využívá metod molekulární biologie, genotypových a fenotypových. V současné době je nejpoužívanější genotypovou metodou PCR, polymerázová řetězová reakce. Cílem práce bylo metodou PCR detekovat určité faktory virulence u kmenů *E. coli* izolovaných z potravin, zakoupených v maloobchodní síti ve Zlínském kraji. Celkem bylo testováno 45 kmenů. U 13 kmenů byl výsledek negativní, nebyla prokázána přítomnost žádného faktoru virulence. U 16 kmenů se vyskytl jeden faktor virulence a u 9 kmenů bylo prokázáno několik faktorů virulence. Nejčastěji se vyskytovala kombinace genů *iss* a *iucD* a kombinace *iucD* a *tsh*. Tyto kombinace se dost často vyskytují u aviárních patogenních kmenů *E. coli* (APEC). Kmeny, ve kterých se tyto kombinace vyskytly, byly izolovány z kuřecího masa a mléčných výrobků.

U vybraných 10 kmenů byla provedena multiplex PCR a výsledky multiplex porovnány s výsledky jednoduchých PCR reakcí. Byl zjištěn rozpor, že u několika kmenů byla při multiplex PCR prokázána přítomnost faktorů virulence, zatímco u jednoduchých PCR reakcí byl výsledek negativní. Pro ideální výsledky by bylo nutné ještě multiplex PCR optimalizovat.

V současné době je kladen velký důraz na bezpečnost a hygienu potravin. K systému preventivních opatření v rámci bezpečnosti potravin bezesporu patří i výše uvedené metody detekce patogenních mikroorganismů.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270s. ISBN 80-210-4207-9
- [2] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
- [3] OTTOBONI, Laura M. M., Renato H. ORSI, Nancy C. STOPPE a Maria Inês Z. SATO. Identification of *Escherichia coli* from groups A, B1, B2 and D in drinking water in Brazil. *Journal of Water and Health*. 2007, roč. 5, č. 2, s. 323-7. ISSN 14778920. DOI: 10.2166/wh.2007.028.  
Dostupné z: < <http://www.iwaponline.com/jwh/005/jwh0050323.htm>>
- [4] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 361 s. ISBN 80-856-0571-6
- [5] BEDNÁŘ, Marek, et al. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha : Marvil, 1996. 588 s. ISBN 80-85827-16-6
- [6] *Escherichia coli*, [online], [cit. 2012-02-24].  
Dostupné z WWW: < [http://wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](http://wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)>
- [7] CLERMONT, S. BONACORSI a E. BINGEN. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000-10-01, roč. 66, č. 10, s. 4555-4558. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.  
Dostupné z:< <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>>
- [8] KOLEKTIV, Oldřich Nečas a.kol. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3., přeprac. vyd., V nakl. H. Jinočany: H, 2000. ISBN 80-860-2246-3.
- [9] ŠMAJS, D., MICENKOVÁ L., ŠMARDA J., VRBA M., ŠEVČÍKOVÁ A., VALIŠOVÁ Z. a WOZNICOVÁ V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiology*. 2010, roč. 10, č. 1, s. 288. ISSN 1471-2180. DOI: 10.1186/1471-2180-10-288.

Dostupné z: < <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/288>>

- [10] *Transcriptional activator Agar – Escherichia coli*, [online], [cit. 2012-02-24].

Dostupné z : < <http://www.uniprot.org/uniprot/P43464>>

- [11] HOLKO, Ivan, Tatiana BISOVA, Zuzana HOLKOVA a Vladimír KMET.

Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. *Food Control*. 2006, roč. 17, č. 5, s. 393-396. ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.01.007.

Dostupné z: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713505000368>>

- [12] PEREIRAA, A. C. M., BRITTO-FILHOB, J. D., DE CARVALHOC, J.J., DAS GRAÇAS DE LUNAA, M., ROSA, A. C. P. Enteroaggregative *Escherichiacoli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 2008, roč. 45, 5-6. ISSN 310-34. DOI:10.1016/.micpath.2008.07.001.

Dostupné z:

< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401008000983>>

- [13] ANANIAS, M. a YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of septicemic *E. coli* isolated from patients with sepsis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008, roč. 41, s. 877-883 ISSN 0100-879X.

- [14] [http://fv1.vfu.cz/export/sites/fvl/sekce\\_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie\\_pro\\_farmaceuty/prednaska\\_4.pdf](http://fv1.vfu.cz/export/sites/fvl/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/prednaska_4.pdf) [online]. [cit. 2012-02-28].

- [15] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-868-5000-5

- [16] SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005, roč. 18, č. 2, s. 264-292. ISSN 0893- 8512. DOI: 10.1128/CMR.18.2.264-292.2005.

Dostupné z: < <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.18.2.264-292.2005>>

- [17] ORDEN, J.A, DOMÍNGUEZ-BERNAL, G., MARTÍNEZ-PULGARÍN, S., BLANCO, M., BLANCO, J.E., MORA, A., BLANCO J.E., a DE LA FUENTE, R. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. *In-*

*ternational microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. 2007, roč. 10, č. 1. ISSN 1139-670

Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384887>>

- [18] ZAHRADNICKÝ, Jiří. *Mikrobiologie a epidemiologie*: Učeb. text pro stř. zdrav. šk., stud. obor zdrav. laborant. Vyd. 1. Praha, 1987.
- [19] DURIEZ, P., CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E., CHAVENTRÉ, A., ELION, J., PICARD, B. a DENAMUR, E. Commensal *Escherichia coli* isolated are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology June*. 2001. roč.147, č.6, s. 1671-6. ISSN 1350-0872
- Dostupné z: <<http://mic.sgmjournals.org/content/147/6/1671.full>>
- [20] *Pathogenic E. coli* [online]. [cit. 2012-03-18].
- Dostupné z: <[http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli\\_4.html](http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli_4.html)>
- [21] *Escherichia coli* [online]. [cit. 2012-03-20]. Dostupné z: <[http://homepage.usack.ca/~vim458/virology/studpages2007/Chad\\_Jan\\_Amy/ecoli](http://homepage.usack.ca/~vim458/virology/studpages2007/Chad_Jan_Amy/ecoli)>
- [22] PAIDB. *Pathogenicity Islands Database* [online]. [cit. 2012-03-18].
- Dostupné z: <[http://www.gem.re.kr/paidb/about\\_paidb.php](http://www.gem.re.kr/paidb/about_paidb.php)>
- [23] KHAI, L.T.L, VUONG, P.Q., KOBAYASHI, H., PHAN, T.T., LOC, Ch. B., YAMASAKI, S. and TANIGUCHI, T. Isolation, identification and treatment of piglets' diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99, 987P in Cantho province, Vietnam. Dostupné z: <<http://www.ctu.edu.vn/institutes/mdi/jircas/JIRCAS/research/workshop/Pro02/C29-Isolation%20,%20Identification%20and%20Treatment.pdf>>
- [24] MC GRATH, Stephen a Douwe van SINDEREN. *Bacteriophage: genetics and molecular biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, c2007, viii, 3431. ISBN 978-190-4455-141.
- [25] BARTEL, P. L., ROECKLEIN, J. A., SENGUPTA D. a FIELDS S. A protein linkage map of *Escherichia coli* bacteriophage T7. *Nature Genetics*. 1996, roč. 12, č. 1, s. 72-77. ISSN 1061-4036. DOI: 10.1038/ng0196-72

[26] LEUNG, P.H.M., J. S. M. PEIRIS, W. W. S. NG, R. M. ROBINS-BROWNE, K. A. BETTELHEIM a W. C. YAM. A Newly Discovered Verotoxin Variant, VT2g, Produced by Bovine Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, roč. 69, č. 12, s. 7549-7553. ISSN 0099-2240. DOI:10.1128/AEM.69.12.7549-7553.2003.

Dostupné z: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.69.12.7549-7553.2003>>

[27] SHAW, D. J., C. JENKINS, M. C. PEARCE, T. CHEASTY, G. J. GUNN, G. DOUGAN, H. R. SMITH, M. E. J. WOOLHOUSE a G. FRANKEL. Shedding patterns of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains in a cohort of calves and their dams on a scottish beef farm. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, roč. 70, č. 12, s. 7456-7465. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.70.12.7456-7465.2004.

Dostupné z: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.70.12.7456-7465.2004>>

[28] MELLATA, M., M. DHO-MOULIN, C. M. DOZOIS, R. CURTISS III, P. K. BROWN, P. ARNE, A. BREE, C. DESAUTELS a J. M. FAIRBROTHER. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infection and Immunity*. 2003, roč. 71, č. 1, s. 536-540. ISSN 0019-9567. DOI: 10.1128/IAI.71.1.536-540.2003.

Dostupné z: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.71.1.536-540.2003>>

[29] JIČÍNSKÁ, Eva a Jana HAVLOVÁ. *Metody detekce patogenních mikroorganismů v potravinách*. Vyd. 1. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1996, 115 s. ISBN 80-851-2049-6.

[30] ŠTĚPÁN, J., Pantůček R., Doškař J.: Molecular Diagnostics of Clinically Important Staphylococci. *Folia. Microbiol.* 2004. roč. 49: s.353-86. Dostupné z: <[http://www.cssm.info/priloha/fm2004\\_353.pdf](http://www.cssm.info/priloha/fm2004_353.pdf)>

[31] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1

[32] *Metody analýzy nukleových kyselin* [online]. [cit. 2012-04-28]. Dostupné z:

<<http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/bc-skripta/kapitola10.pdf>>

- [33] ROSYPAL, S. a kol. *Úvod do molekulární biologie, díl třetí*. 3. vyd. Brno. 2000, 300 s. ISBN 80-902562-2-8.
- [34] KRÁLOVÁ, B. a kol. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko- technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [35] *Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)* [online]. [cit. 2012-03-28]. Dostupné z:  
< <http://biologie.upol.cz/metody/Amplifikace%20pomoci%20PCR.htm> >
- [36] *Syntéza oligonukleotidů* [online]. [cit. 2012-03-28].  
Dostupné z: < <http://biologie.upol.cz/metody/Synteza%20oligonukleotidu.htm> >
- [37] SERVIN, Alain. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, roč. 18, č. 2. s. 264-292. ISSN 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.18.2.264-292.2005.  
Dostupné z: < <http://cmr.asm.org/content/18/2/264.full.pdf+html> >
- [38] CLARK, David P. *Molecular biology. academic cell update*. Boston: Academic Press/Elsevier, c2010, 784 s. ISBN 978-012-3785-893
- [39] WANG, Gehua, CLARK, Clifford G., RODGERS†, Frank G. †. Detection in Escherichia coli of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal Clinical Microbiol.* 2002, roč.10, č. 40, s.3613-3619. DOI: 10.1128/JCM.40.10.3613-3619.2002.  
Dostupné z: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130888/> >
- [40] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D. Colicins -exocellular lethal proteins of Escherichia coli. *Folia Microbiol.*, Německo. 1998, roč. 43, č. 6, s. 563-582. ISSN 0015-5632
- [41] ŠMAJS, D., MICENKOVÁ L., ŠMARDA J., VRBA M., ŠEVČÍKOVÁ A., VA LIŠOVÁ Z. a WOZNICOVÁ V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal Escherichia coli: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiology.* 2010, roč. 10, č. 1, s. 288. ISSN 1471-2180. DOI: 10.1186/1471-2180-10-288.

Dostupné z: < <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/288>>

- [42] JEZIOROWSKI†, A. a GORDON D. M. Evolution of microcin V and Colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*∇. *J. Bacteriol.* 2007, roč. 189, č. 19. s. 7045-52. DOI: 10.1128/JB.00243-07.

Dostupné z:<<http://jb.asm.org/content/189/19/7045.full>>

- [43] PONS, A.M., F. DELALANDE, M. DUARTE†, S. BENOIT, I. LANNELUC, S. SABLÉ, A. VAN DORSSELAER a G. COTTENCEAU. Genetic analysis and complete primary structure of microcin L. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, roč. 48, č. 2. s. 505-513. DOI: 10.1128/AAC.48.2.505-513.2004.

Dostupné z: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321509/>>

- [44] ŠTULÍK, K. a kol. *Vysokoučinné analytické separace.*

Dostupné z: < <http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/separace.pdf>>

- [45] RŮŽIČKA, F., HORKÁ M., HOLÁ V. a VOTAVA M. Capillary isoelectric focusing-useful tool for detection of the biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, roč. 68, č. 3, s. 530-535, ISSN 0167-7012. 2006

- [46] KUSTOS, Ildikó, KOCSIS Béla a KILÁR Ferenc. Bacterial outer membrane protein analysis by electrophoresis and microchip technology. *Expert Review of Proteomics*. 2007, roč. 4, č. 1, s. 91-106. ISSN 1478-9450. DOI: 10.1586/14789450.4.1.91.

Dostupné z: <<http://www.expert-reviews.com/doi/abs/10.1586/14789450.4.1.91>>

- [47] MA, Li-na, Jie ZHANG, Hao-tai CHEN, Jian-hua ZHOU, Yao-zhong DING a Yong-sheng LIU. An overview on ELISA techniques for FMD. *Virology Journal*. 2011, roč. 8, č. 1, s. 419-. ISSN 1743-422x. DOI: 10.1186/1743-422X-8-419.

Dostupné z: < <http://www.virologyj.com/content/8/1/419>>

- [48] BELL, C. Development of a sandwich ELISA and comparison with PCR for the detection of F11 and F165 fimbriated *Escherichia coli* isolates from septicemic disease in farm animals. *Veterinary Microbiology*. 2002, roč. 85, č. 3, s. 251-257. ISSN 03781135. DOI: 10.1016/S0378-1135(01)00514-4.

Dostupné z: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113501005144>>

- [49] Patogenní *Escherichia coli* [online] [cit. 2012-05-04].

Dostupné z:

<[http://utbfiles.cepac.cz/moduly/M0010\\_potravinarska\\_mikrobiologie/distančni\\_text/M0010\\_potravinarska\\_mikrobiologie\\_distančni\\_text.pdf](http://utbfiles.cepac.cz/moduly/M0010_potravinarska_mikrobiologie/distančni_text/M0010_potravinarska_mikrobiologie_distančni_text.pdf)>

- [50] PARREIRA, V.R. a C.L. GYLES. A Novel pathogenicity island integrated Adjacent to the *thrW* tRNA Gene of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Encodes a Vacuolating Autotransporter Toxin. *Infect. Immun.* 2003, roč. 71, č. 9, s. 5087-96. ISSN 5087-5096. DOI: 10.1128/IAI.71.9.2003

Dostupné z: < <http://iai.asm.org/content/71/9/5087.full>>

- [51] VANN, W. F., D. A. DAINES, A. S. MURKIN, M. E. TANNER, D. O. CHAFFIN, C. E. RUBENS, J. VIONNET a R. P. SILVER. The NeuC Protein of *Escherichia coli* K1 Is a UDP N-Acetylglucosamine 2-Epimerase. *Journal of Bacteriology.* 2004, roč. 186, č. 3, s. 706-712. ISSN 0021-9193. DOI: 10.1128/JB.186.3.706-712.2004.

Dostupné z: < <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.186.3.706-712.2004>>

- [52] KWON, Soon-Gu, Se-Yeoun CHA, Eun-Ju CHOI a Bokyoung KIM. Epidemiological Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology and Virology.* 2008, roč. 38, č. 4, s. 179-188. Dostupné z:

< <http://synapse.koreamed.org/Synapse/Data/PDFData/0079JBV/jbv38-179.pdf>>

- [53] JAKOBSEN, Lotte, Daniel J. SPANGHOLM, Karl PEDERSEN, Lars B. JENSEN, Hanne-Dorthe EMBORG, Yvonne AGERSØ, Frank M. AARESTRUP, Anette M. HAMMERUM a Niels FRIMODT-MØLLER. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients?. *International Journal of Food Microbiology.* 2010, roč. 142, č.1-2, s. 264-272. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.025.

Dostupné z: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510003673>>

- [54] LEE, Sang Yup. *Systems biology and biotechnology of Escherichia coli*. Dordrecht: Springer, c2009, 462 s. ISBN 14-020-9394-2
- [55] EWERS, C, G LI, H WILKING, S KIEBLING, K ALT, E ANTAO, C LATUSUNUS, I DIEHL, S GLODDE a T HOMEIER. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: How closely related are they?. *International Journal of Medical Microbiology*. 2007, roč. 297, č. 3, s. 163-176. ISSN 14384221. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.01.003.  
Dostupné z: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422107000173>>
- [56] JOHNSON, T. J. a L. K. NOLAN. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of Escherichia coli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2009-11-29, roč. 73, č. 4, s. 750-774. ISSN 1092-2172. DOI: 10.1128/MMBR.00015-09.  
Dostupné z: < <http://mibr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00015-09>>
- [57] NAKAZATO, Gerson, Tatiana Amabile de CAMPOS, Eliana Guedes STEHLING, Marcelo BROCCCHI a Wanderley Dias da SILVEIRA. Virulence factors of avian pathogenic Escherichia coli (APEC). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2009, roč. 29, č. 7, s. 479-486. ISSN 0100-736x. DOI: 10.1590/S0100-736X2009000700001.  
Dostupné z: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext)>
- [58] GERMON, P. IbeA, a virulence factor of avian pathogenic Escherichia coli. *Microbiology*. 2005-04-01, roč. 151, č. 4, s. 1179-1186. ISSN 1350-0872. DOI: 10.1099/mic.0.27809-0.  
Dostupné z: < <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.27809-0>>
- [59] EWERS, Christa, Traute JANßEN, Sabine KIEßLING, Hans-C. PHILIPP a Lothar H. WIELER. Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic Escherichia coli by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases*. 2005, roč. 49, č. 2, s. 269-273. ISSN 0005-2086. DOI: 10.1637/7293-102604R. Dostupné z: < <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1637/7293-102604R>>
- [60] ROCHA, Ana C.G.P., Silvio L.S. ROCHA, Carlos A.V. LIMA-ROSA, Guilherme F. SOUZA, Hamilton L.S. MORAES, Felipe O. SALLE, Lucas B. MORAES



a Carlos T.P. SALLE. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008, roč. 28, č. 3, s. 183-186. ISSN 0100-736x. DOI: 10.1590/S0100-736X2008000300009.

Dostupné z: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext)>

- [61] FALBO, V., PACE, T., PICCI, L., PIZZI, E. a CAPROLI, A. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1993, roč. 61, č. 11, s. 4909–4914. ISSN 0019-9567

Dostupné z: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281255>>

- [62] THARIATH, A., SOCHA, D., VALVANO, M.A. a WISWANATHA, T. . Construction and biochemical characterization of recombinant cytoplasmic forms of the *IucD* protein (lysine:N6-hydroxylase) encoded by the *pColV-K30* aerobactin gene cluster. *J Bacteriol*. 1993, roč. 175, č. 3, s.589–596.

Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC196193/>>

- [63] ROZUMKOVÁ, J. Výskyt antibiotické rezistence u kmenů *E. coli* izolovaných z potravin. Zlín, 5. 5. 2010, diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati, fakulta technologická, vedoucí diplomové práce: Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

- [64] MORA, Azucena, Cecilia LÓPEZ, Ghizlane DABHI, Miguel BLANCO, Jesús E BLANCO, María ALONSO, Alexandra HERRERA, Rosalía MAMANI, Stéphane BONACORSI, Maryvonne MOULIN-SCHOULEUR a Jorge BLANCO. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1: K1. *BMC Microbiology*. 2009, roč. 9, č. 1, s. 132. ISSN 1471-2180. DOI: 10.1186/1471-2180-9-132.

Dostupné z: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/132>>

- [65] *IucD* – *IucD* protein.[online]. [cit. 2012-05-04].

Dostupné z: <<http://www.wikigenes.org/e/gene/e/1039579.html>>

- [66] TOMÁŠOVÁ, Z. Rozdělení kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin do fylogenetických skupin, Zlín, 1. 5. 2012, diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati, fakulta technologická, vedoucí diplomové práce: Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

- [67] PASS, M.A., ODEDRA†, R. and BATT, R. M. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol.* 2008, roč. 38, č. 5. s. 2001-4. DOI: 0095-1137/00/\$04.00+0.  
Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86652/>>
- [68] JOHNSON, T. J., WANNEMUEHLER, Y. M., NOLAN, L. K. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, roč. 74, č. 8, s.2360-2369. DOI: 10.1128/AEM.02634-07  
Dostupné z: <<http://aem.asm.org/content/74/8/2360.full>>
- [69] ZAPATA, G., CROWLEY, J. M. and VANN, W. F. Sequence and expression of the *Escherichia coli* K1 *neuC* gene product. *J Bacteriol.* 1992, roč. 174, č. 1. s. 315–319. DOI: 0021-9193/92/010315-05\$02.00/0.  
Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC205711/>>
- [70] DOZOIS, Ch. M., DHO-MOULIN, M., BREÉ, A., FAIRBROTHER, J. M., DE SAUTE, C. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun.* 2000, roč. 68, č. 7. s.4145–4154.  
Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858231>>
- [71] BREST, P., L. TURCHI, G. LE'NEGRATE, F. BERTO, C. MOREILHON, B. MARI, G. PONZIO a P. HOFMAN. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 inhibits intestinal epithelial wound healing in vitro after mechanical injury. *Infection and Immunity.* 2004, roč. 72, č. 10, s. 5733-5740. ISSN 0019 9567. DOI: 10.1128/IAI.72.10.5733-5740.2004.  
Dostupné z: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.72.10.5733-5740.2004>>
- [72] YAXIAN YAN, HUIYING ZHANG, LUMING XIA, LIANGKE SHU, JIANHE SUN. *Identification and characterization of stx2 converting bacteriophage from Shiga-toxin-producing Escherichia coli O157 strains of animal origin.* Bioinformatics and Biomedical Engineering , 2009. ICBBE 2009, 3rd.International conference, 11-13 June 2009
- [73] GERRISH, R. S., LEE, J. E., REED, J., WILLIAMS, J., FARRELL, L. D., SPIEGEL, K. M., SHERIDAN, P. P. a SHIELDS, M. S. PCR versus hybridization for detecting virulence genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerging In-*

*fectious Diseases*. 2007, roč. 13, č. 8, s. 1253-1255. ISSN 1080-6040. DOI: 10.3201/eid1308.060428.

Dostupné z: <[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/8/06-0428\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/8/06-0428_article.htm)>

[74] COOKSON, A. L., HAYES, CH. M., PEARSON, G. R., ROE, J. M. Isolation from a sheep of an attaching and effacing *Escherichia coli* O115:H2 with a novel combination of virulence factors. *J. Med. Microbiol.* 2002, roč. 51, č. 12. s. 1041-1049. ISSN 0022-2615.

Dostupné z: <<http://jmm.sgmjournals.org/content/51/12/1041.full.pdf+html>>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

bp	párů bází
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dATP	Deoxyadenin trifosfát
dCTP	Deoxycytidin trifosfát
dGTP	Deoxyguanozin trifosfát
dNTP	Deoxynukleozid trifosfát
primer F	Forward primer
primer R	Reverse primer
PCR	Polymerázová řetězová reakce

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

*Obr. 1. Escherichia coli [21].*

*Obr. 2. Schéma polymerázové řetězové reakce [67].*

*Obr. 3. Výsledky jednoduchých PCR reakcí, detekce genu iss, iucD a neuC.*

*Obr. 4. Výsledky jednoduchých PCR reakcí, detekce genu papC, vat, tsh.*

*Obr. 5. Výsledky jednoduchých PCR reakcí, detekce genu iss, neuC, tsh 1.*

*Obr. 6. Výsledky jednoduchých PCR reakcí, detekce genu iss, neuC a tsh 2.*

*Obr. 7. Výsledky multiplex PCR u vybraných kmenů.*

**SEZNAM TABULEK**

*Tab. 1. Použité primery 1. skupiny [59,64].*

*Tab. 2. Použité primery 2. skupiny [11,67].*

*Tab. 3. Seznam použitých kmenů Escherichia coli [66].*

*Tab. 4. Složení amplifikační směsi pro jednoduchou PCR reakci při použití primerů 1.sk.*

*Tab. 5. Složení amplifikační směsi pro jednoduchou PCR reakci při použití primerů 2. sk.*

*Tab. 6. Složení amplifikační směsi pro multiplex reakci PCR.*

*Tab. 7. Podmínky PCR reakce za použití primerů 1. sk.*

*Tab. 8. Podmínky PCR reakce za použití primerů 2. sk.*

*Tab. 9. Podmínky multiplex PCR.*

*Tab. 10. Výskyt sledovaných faktorů virulence u kmenů izolovaných z potravin.*

*Tab. 11. Výskyt dalších faktorů virulence u 3 kmenů izolovaných z potravin.*