

# Moderní metody detekce patogenů v pitné vodě

Lenka Šidlíková, DiS.

---

Bakalářská práce  
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2009/2010

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka ŠIDLÍKOVÁ, DiS.**

Osobní číslo: **T07198**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie a řízení v gastronomii**

Téma práce: **Moderní metody detekce patogenů ve vodě.**

Zásady pro vypracování:

1. **Vypracování seznamu hlavních patogenních mikroorganismů vyskytujících se v pitné či užitkové vodě.**
2. **Určení hlavních moderních metod využívaných ke stanovení patogenních mikroorganismů.**
3. **Shrnutí základních informací o prokaryotické buňce s ohledem na využití variability DNA k detekci patogenů.**
4. **Popis vybrané molekulárně-genetické metody, např. RT PCR a jejich možností pro detekci patogenů.**
5. **Shrnutí získaných informací a vypracování závěru shrnujícího výhody a nevýhody moderních metod.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] ALBERTS, B. et al. *Molecular biology of the cell*, Published by Garland Science UK 2008. ISBN 978-0-8153-4196-2.

[2] ROSYPAL S. *Úvod do molekulární biologie I.*, Brno 1998. ISBN 80-902562-0-1.

[3] HARTL D. L., JONES, E. W. *Genetics: Principles and Analysis Fourth Edition.*, ISBN 0-7637-0489-X.

[4] VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun, Brno 2003, ISBN 80-902896-6-5.

[5] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Academia, Praha 2008, ISBN 978-80-200-1703-1.

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.**

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání bakalářské práce:

**4. února 2010**

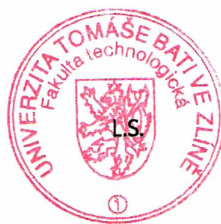
Termín odevzdání bakalářské práce:

**30. května 2010**

dne **- 8. 04. 2010**



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*ředitel ústavu*

## **ABSTRAKTA**

Bakalářská práce „Moderní metody detekce patogenů v pitné vodě“ je zaměřená na problematiku mikrobiální kontaminace pitné vody. Úvodní kapitola se věnuje obecnému popisu, rozdělení a využití vod. První část práce je shrnutím nejvýznamnějších mikroorganismů, vyskytujících se ve vodách. Mikroorganismy jsou zde rozděleny podle hygienického a zdravotního významu na indikátory obecného znečištění, fekálního znečištění a na mikroorganismy hygienicky významné. Pro každou skupinu mikroorganismů jsou uvedeny klasické metody stanovení i moderní metody, které popisuje odborná literatura.

Druhá část práce začíná úvodem do genetiky – vysvětlením základních termínů, a pokračuje popisem metody PCR (polymerázová řetězová reakce) a jejích modifikací. Konkrétněji jsem se zaměřila na metodu real-time PCR, její průběh, výhody i nevýhody. Tato metoda patří k moderním velmi přesným a celosvětově rozšířeným metodám, jejichž využití v rámci detekce patogenů v pitné vodě je na vzestupu.

Závěr shrnuje možnosti této poměrně nové molekulárně biologické metody, kterou lze použít v mnoha oborech – např. ve zdravotnictví (určení genetických vad a onemocnění, detekce patogenů v klinických materiálech), k průkazu mikroorganismů ve vzorcích vody či v kriminalistice (fingerprinting).

Klíčová slova: mikroorganismy, voda, DNA, RNA, PCR, real-time PCR

## **ABSTRACT**

This thesis "Modern methods of detection of pathogens in drinking water" is focused on microbial contamination of drinking water. The introductory chapter deals with the general description, distribution and use of water. The first part is a summary of the most important microorganisms occurring in the waters. Microorganisms are classified according to their hygienic and medical importance, the indicators of general pollution and faecal contamination of hygienically relevant microorganisms. For each group of microorganisms, there are presented classical and modern methods of measurement, as described in the expert literature.

The second part begins with an introduction to genetics - an explanation of basic terms, and goes on to describe PCR - polymerase chain reaction and its modifications. More specifically, I focused on the method of real-time PCR, its course, advantages and disadvantages. This method belongs to very accurate and widespread used methods whose detection of pathogens in drinking water is on the rise.

The conclusion summarizes these relatively new molecular biological methods, which can be used in many fields - such as health care (identification of genetic defects and disease, detection of pathogens in clinical materials) for the detection of microorganisms in water samples and in criminology (fingerprinting).

Key words: microorganisms, water, DNA, RNA, PCR, real-time PCR

Příjmení a jméno: Lenka Šidlíková, DiS.

Obor: Technologie a řízení v gastronomii

## 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 10. 5. 2010



.....

<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 vzdělávacímu 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 udělení 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 vynaložil, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlíží k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

Čemukoliv se učíš, učíš se pro sebe.

*Petronius*

***Poděkování***

Zde bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce Ing. Petrovi Humpolíčkovi za odborné vedení práce, za cenné rady, ochotu pomoci a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu po celou dobu studia.



## **Obsah:**

<b>1 VODA</b>	<b>12</b>
<b>1.1 fyzikální a chemické vlastnosti vody</b>	<b>12</b>
<b>1.2 výskyt a zdroje vody</b>	<b>12</b>
<b>1.3 dělení vod</b>	<b>13</b>
<b>1.4 voda a hygiena</b>	<b>13</b>
<b>2 MIKROORGANISMY VE VODĚ</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Indikátory obecného znečištění</b>	<b>14</b>
2.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
<b>2.2 Indikátory fekálního znečištění</b>	<b>16</b>
2.2.1 Koliformní bakterie	16
2.2.1.1 <i>Escherichia</i>	16
2.2.1.2 <i>Citrobacter</i>	17
2.2.1.3 <i>Enterobacter</i>	17
2.2.2 <i>Enterococcus</i>	18
2.2.3 <i>Clostridium</i>	19
<b>2.3 Hygienicky významné mikroorganismy</b>	<b>20</b>
2.3.1 <i>Salmonella</i>	20
2.3.1.1 Primárně antropogenní salmonely	20
2.3.1.2 Primárně zoopatogenní salmonely	20
2.3.2 <i>Shigella</i>	21
2.3.3 <i>Vibrio</i>	22
2.3.3.1 <i>Vibrio cholerae</i>	22
2.3.4 <i>Legionella</i>	23
2.3.5 <i>Staphylococcus</i>	24
2.3.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.3.5.2 <i>Staphylococcus epidermis</i>	25
2.3.6 <i>Streptococcus</i>	26
2.3.6.1 $\alpha$ -hemolytické streptokoky – viridující	26

2.3.6.2 $\beta$ -hemolytické streptokoky – pyogenní	27
2.3.7 <i>Aeromonas</i>	28
2.3.8 <i>Candida</i>	29
2.3.8.1 <i>Candida albicans</i>	29
2.3.9 Leptospiry	30
2.3.10 Enteroviry	31
2.3.10.1 Polioviry	31
2.3.10.2 Coxsackieviry	31
2.3.10.3 Echoviry	32
<b>3. ZÁKLADY GENETIKY</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Buňka</b>	<b>33</b>
3.1.1 Chromozom	34
3.1.2 DNA	35
3.1.2.1 Význam DNA v praxi	35
3.1.2.2 Replikace DNA	36
3.1.2.3 Transkripce DNA	36
3.1.2.4 Denaturace	36
3.1.3 RNA	37
3.1.4 Genetické změny	38
3.1.5 Variabilita DNA	39
3.1.6 Mikrosatelity	39
3.1.7 Minisatelity	39
3.1.8 Bodové mutace	40
<b>4 METODA PCR</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Historie PCR</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Princip metody PCR</b>	<b>42</b>
<b>4.3 Reakční směs pro PCR</b>	<b>43</b>
<b>4.4 PCR-RFLP</b>	<b>44</b>
<b>4.5 Modifikace PCR</b>	<b>45</b>

4.5.1 RT PCR	45
4.5.2 Multiplex PCR	45
4.5.3 Nested PCR	45
4.5.4 Miniprimer PCR	46
4.5.5 Real-time PCR	46
<b>4.6 PCR vs. real-time PCR</b>	<b>47</b>
<b>ZÁVĚR</b>	<b>48</b>
<b>SEZNAM LITERATURY</b>	<b>49</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b>	<b>55</b>

## 1 VODA

Voda je stálou součástí všech živých systémů. Tvoří největší podíl hmotnosti u člověka i u živočichů. V lidském zárodku je voda až z 95%, u dospělého člověka jen 60%; poměrné množství vody se s věkem snižuje [Jirásek *et al.*, 1966].

Voda je univerzální prostředí, důležité pro průběh složitých životních dějů. Přítomnost vody v organismu umožňuje látkovou a energetickou výměnu i všechny fyziologické funkce. Většina látek je využitelná ve formě roztoku, proto je voda také důležitým rozpouštědlem. Část vody je vázána na látky koloidní. V organismu je voda zastoupena jako intracelulární i extracelulární tekutina.

Zdrojem vody jsou nejen nápoje, ale i pevné potraviny: zelenina (až 98 % vody), ovoce, (90 %), maso (75 %). Při oxidaci živin se tvoří tzv. metabolická voda (cca 350 ml/den). Denně přijme dospělý člověk asi 2,5 l vody a stejné množství průměrně vyloučí. Voda není jen důležitá transportní látka a prostředí pro biochemické děje, ale je přímým účastníkem základního biochemického pochodu, který umožňuje život na planetě, a to fotolýzy vody [Hygienický význam..., 1979].

### 1.1 fyzikální a chemické vlastnosti vody

V systému látek má voda výjimečné postavení. Vodík a kyslík mají po třech izotopech, lze tedy říci, že voda je směs 42 látek (sloučenina tří různých kyslíků se třemi různými vodíky). Mezi ostatními sloučeninami nemá voda z fyzikálně-chemického hlediska obdoby. Ve všech vlastnostech vykazuje anomálie. Prostorovým uspořádáním molekul je dán její polární charakter. Pokud by se chovala voda stejně jako podobné sloučeniny, neexistoval by na Zemi život v takové podobě, jak je známe [Hygienický význam..., 1979].

### 1.2 výskyt a zdroje vody

Voda je součástí pevnin, oceánů i atmosféry. Zdroje vody dělíme na podzemní a povrchové (součást hydrosféry). Pod pojmem vodní zdroj se rozumí povrchové a podzemní vody, které jsou využívány nebo využitelné v budoucnu pro pokrytí potřeb společnosti [Hygienický význam..., 1979].

### **1.3 dělení vod**

Podle výskytu dělíme vody na povrchové a podzemní. Povrchové vody dále dělíme na tekoucí a stojaté. Podle znečištění dělíme vody na saprobní, katarobní, oligosaprobní, mesosaprobní a hyperpolysaprobní pásma. Saprobity – stupeň znečištění [Hygienický význam..., 1979].

### **1.4 voda a hygiena**

Voda je jedním z limitujících faktorů rozvoje společnosti v oblasti výroby i životního prostředí. Zdroje vody nejsou nevyčerpatelné. Pitná voda nesmí být článkem přenosu chorob, nesmí ohrozit lidské zdraví, a to ani svým chemickým složením, a má určité biologické vlastnosti [Hygienický význam..., 1979].

## 2 MIKROORGANISMY VE VODĚ

Přírodní voda obsahuje vždy určité množství mikroorganismů, ty jsou jejím živým společenstvem. Jejich množství a druhové zastoupení je proměnlivé a závislé na více faktorech. Základem mikrobiologického vyšetření vod je sledování mikroorganismů, které ukazují na obecné a fekální znečištění vody. Kromě patogenních bakterií se ve vodách sleduje i výskyt virů [Hygienický význam..., 1979].

### 2.1 Indikátory obecného znečištění

Mezi bakterie obecného znečištění řadíme dvě skupiny organotrofních bakterií. Organotrofní bakterie tvoří nesourodou skupinu mikroorganismů. Tyto organismy mají jednu charakteristickou vlastnost – získávají živiny i zdroj uhlíku a dusíku pouze z organických látek [Clark a Pagel, 1977].

Průkaz těchto bakterií informuje o stavu vodního zdroje vzhledem k jeho okolí a o typu celkového mikrobiálního oživení vody. Mezi časté zástupce patří např. pseudomonády, gramnegativní nefermentující tyčinky, sporulující bakterie, některé kvasinky, aktinomycety, apod. Indikátorům obecného znečištění se z hygienického hlediska nepřipisuje takový význam jako mikroorganismům fekálního znečištění. Riziko, že se mezi nimi mohou vyskytovat i patogenní mikroorganismy je poměrně nízké. Údaje o jejich výskytu slouží k informaci o celkovém mikrobiálním znečištění. Stanovení těchto mikroorganismů tedy slouží k ekologickému posouzení kvality. Princip stanovení je založen na schopnosti bakterií tvořit okem viditelné kolonie [Hygienický význam..., 1979].

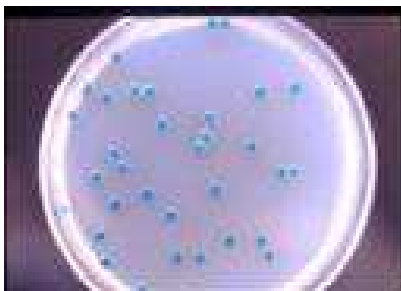
#### 2.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* představuje klinicky nejvýznamnější druh z celého rodu *Pseudomonas* [Mena a Gerba, 2009]. Vyskytuje se hojně v různých vodách, ve střevě obratlovců, v rostlinách i v půdě.

Vzhledem k nenáročnosti mikroorganismu a charakteristickým znakům kolonií je jejich přímý důkaz snadný. Příležitostně je pro člověka patogenní, zejména pro starší osoby, malé děti a kojence [Votava *et al.*, 2003].

Výskyt *Pseudomonas aeruginosa* se stanovuje u balených vod. Nejvyšší mezní hodnota je 0 KTJ (kolonie tvořících jednotek) [252/2004 Sb.]. Alternativní metodou používanou pro detekci

*Pseudomonas aeruginosa* je FT-IR spektroskopie a vícerozměrná analýza. Touto metodou lze rozlišit blízké příbuzné bakterie podle rozdílů v biochemických a fenotypových vlastnostech [Al-Qadiri *et al.*, 2006].



Obr.1 *Pseudomonas aeruginosa*

## 2.2 Indikátory fekálního znečištění

Při ověřování mikrobiologické nezávadnosti vody se celosvětově používá metoda tzv. indikátorů fekálního znečištění. Mezi ukazatele fekálního znečištění řadíme koliformní bakterie, enterokoky a anaerobní klostridia. Tyto bakterie se vyskytují nejen v lidských a zvířecích fekáliích, ale i ve vnějším prostředí. V hygieně vody mají tyto bakterie mimořádný význam. Jejich důkaz je rozhodující pro posouzení, zda je vyšetřovaná voda vhodná pro zásobování, výrobu potravin či jiný průmysl [Hygienický význam..., 1979].

### 2.2.1 Koliformní bakterie

Koliformní bakterie jsou považovány za nejdůležitější ukazatel fekálního znečištění. Jde o skupinu střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou to gramnegativní anaerobní tyčinky, netvořící spory. Nejčastějším zástupcem jsou bakterie z rodu *Escherichia*, *Citrobacter* a *Enterobacter*. Stanovení koliformních bakterií se provádí metodou membránových testů, cytochromoxidázovým testem, testem pro důkaz tvorby plynů a kvasnou zkouškou [Hygienický význam..., 1979].

#### 2.2.1.1 *Escherichia*

Rod *Escherichia* jsou gramnegativní tyčinky, běžně se vyskytující ve střevním traktu lidí i zvířat. Vyznačují se značnou tvarovou variabilitou; typické jsou peritrichní bičky, ale jsou i nepohyblivé kmeny [Hygienický význam..., 1979].

##### *Escherichia coli*

Jde o nejvíce zkoumaný druh, neboť slouží jako modelový organismus pro biochemické, genetické i fyziologické studie [Šilhánková, 2008]. *Escherichia coli* je kultivovatelná na široké škále půd. Na Endově agaru je nápadná purpurová barva kolonií. Je běžnou součástí střevní mikroflóry zdravých lidí. Ve střevě se podílí na tvorbě některých vitamínů, především vitamínu K. Jde ale o podmíněně patogenní mikroorganismus, který může způsobit i chorobné stavy. Mimo střevo je téměř vždy patogenní [Votava *et al.*, 2003].

Detekce *E. coli* se provádí metodou membránových filtrů. Nález je hodnocen jako čerstvé fekální znečištění. Výskyt se stanovuje v balené vodě a ve zdrojích veřejného i individuálního zásobování. Pro všechny vzorky je NMH dána jako 0 KTJ [252/2004 Sb.]. Pro detekci *E. coli* ve vzorcích vody byla vyvinuta metoda rapid real-time NASBA. V této metodě je použito specifických



molekulárních sond, používaných k detekci mRNA během reakce NASBA. Metoda je vysoce citlivá, výhodou je získání výsledků v průběhu 3 – 4 hodin [Heijnen a Medema, 2009].



Obr.2 *Escherichia coli*

### 2.2.1.2 *Citrobacter*

Tento mikrob se běžně vyskytuje ve střevním traktu lidí, ale ve vyšších koncentracích může způsobit onemocnění oslabených jedinců. Je tedy podmíněně patogenní. Nejběžnějším druhem je *Citrobacter freundii* [Šilhánková, 2008].

Pro detekci a kvantifikaci *Citrobacter freundii* se používá 5-nukleáza polymerázová řetězová reakce. Kvalitativní varianta metody sestává z konvenční PCR a kvantitativní varianta používá kinetickou real-time PCR [Kacálková *et al.*, 2005].



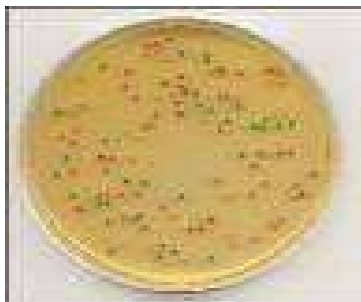
Obr.3 *Citrobacter freundii*

### 2.2.1.3 *Enterobacter*

Enterobaktery jsou druhou nejběžnější bakterií lidského střeva. Pro člověka jsou podmíněně patogenní. Nejvýznamnější druhy pro člověka jsou *Enterobacter choacae*, *E. aerogenes* a *E. sakazakii* [Votava *et al.*, 2003].

Metoda FT-IR spolu s vícerozměrnou statistickou analýzou mohou být použity k detekci, rozlišení a identifikaci kmenů *Enterobacter sakazakii*. V porovnání s klasickými mikrobiologickými

metodami je tato metoda důležitá pro zemědělství, potravinářství i ve zdravotnické oblasti díky rychlé a přesné detekci bakteriálních vzorků [Lin *et al.*, 2009].



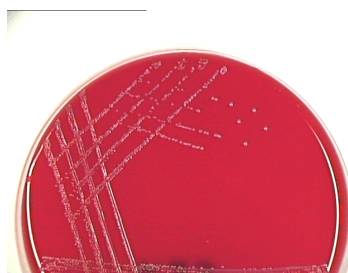
Obr.4 *Enterobacter sakazakii*

### 2.2.2 *Enterococcus*

Fekální streptokoky čili enterokoky jsou grampozitivní koky, které často tvoří diplokoky; některé jsou pohyblivé. Jsou fakultativně anaerobní, resistantní vůči antibiotikům a teplotě. Jsou častými původci zánětů močových cest, endokarditid, sepsí a meningitid. Vyskytují se v intestinálním traktu a v mléčných produktech. Jsou dalším významným indikátorem fekálního znečištění a závažných hygienických závad. Enterokokové infekce jsou u člověka z 90% vyvolány *Enterococcus faecalis* [Hygienický význam..., 1979].

*Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* byly navrženy jako indikátory fekálního znečištění, avšak vyskytují se i na rostlinách, které nepřišly s fekáliemi do styku. Proto jsou tyto mikroorganismy méně specifické než *Escherichia coli* [Šilhánková, 2008].

Laboratorní diagnostika je založena na přímém průkazu – na mikroskopii a kultivaci na krevním agaru a např. na půdě Slanetzově-Bartleyho [Votava *et al.*, 2003]. Výskyt enterokoků se stanovuje u všech vzorků vody. Nejvyšší mezní hodnota je 0 KTJ [252/2004 Sb]. K detekci enterokoků ve vzorcích vody je možno použít metodu Taq DNA. Při této metodě se měří fluorescenční signál on-line, tím je umožněno přímé vyhodnocení výsledků po PCR detekci bez dalších kroků. Zkouška je ukončena do asi 5 h [Frahm a Obst, 2003].



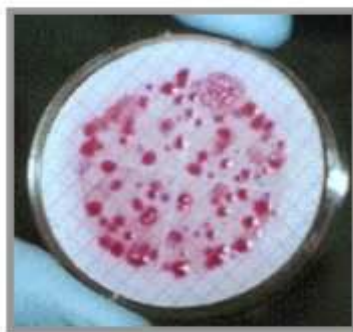
Obr.5 *Enterococcus faecalis*

### 2.2.3 *Clostridium*

Rod *Clostridium* zahrnuje sporulující bakterie rostoucí za anaerobních podmínek. Nejvýznamnější v této skupině je *Clostridium perfringens*, málo toxický mikroorganismus, jehož přítomnost ve střevech je téměř konstantní, proto se jeho důkaz ve vodě používá jako indikátor fekálního znečištění [Votava *et al.*, 2003].

Klostridia se dobře kultivují, vytvářejí značné množství plynu a jejich rozlišení na diagnostických půdách je jednoduché a jednoznačné. Tvoří spory, které se ve vnějším prostředí udržují dlouho, a proto nález těchto bakterií ve vodě pokládáme za ukazatel staršího znečištění. Výskyt anaerobních sporulátů indikuje přítomnost většího množství rozkládajících se organických látek [Hygienický význam..., 1979].

*Clostridium perfringens* produkuje toxin, který má letální a nekrotizující účinky [Votava *et al.*, 2003]. Podle druhu produkovaného toxinu lze rozdělit kmeny do pěti typů [Messelhaeusser *et al.*, 2007]. Kultivačním médiem pro detekci klostridií je masopeptonový agar. Metoda stanovení slouží především k posuzování jakosti vod z hlediska ekologického. Jde o tzv. indikátor virologické a parazitologické kvality pitné vody [Hygienický význam..., 1979]. Klasické metody stanovení nejsou schopné rozlišit o jaký typ klostridia jde. Pro detekci toxinu se používá metoda real-time PCR. Metodu lze použít pro rychlou detekci a snadné zařazení izolátů *C. perfringens* a jako rychlý screening při podezření na otravu potravinou kontaminovanou klostridii. [Messelhaeusser *et al.*, 2007].

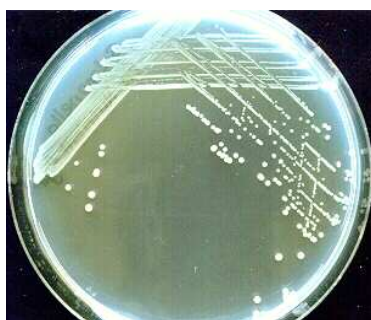


Obr.6 *Clostridium perfringens*

## 2.3 Hygienicky významné mikroorganismy

### 2.3.1 *Salmonella*

Rod *Salmonella* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jde o skupinu gramnegativních bakterií (fakultativně anaerobní tyčinky), které jsou pro člověka patogenní. Patří sem původci paratyfu, břišního tyfu a další druhy, jejichž přirozenými hostitelem jsou zvířata. Salmonely jsou nejčastějšími původci alimentárních nákaz. Salmonelám se při vyšetřování vod věnuje v současné době zvýšená pozornost. Při jejich prokázání ve vodě jim musíme přisuzovat mimořádný význam, neboť základním požadavkem normy je, že voda nesmí obsahovat žádné patogenní bakterie [Hygienický význam..., 1979]. Existují dva druhy salmonel s několika poddruhy. Všechny salmonely významné pro člověka patří do druhu *Salmonella enterica* [Votava *et al.*, 2003].



Obr.7 *Salmonella typhi*

#### 2.3.1.1 Primárně antropogenní salmonely

Do této skupiny patří *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A*, *B* a *C*. Jde o velmi závažné původce tyfů (resp. paratyfů). Do organismu vnikají střevem, avšak střevní příznaky nejsou příliš výrazné. *Salmonella Typhi* lze vypěstovat z krve a moči, později i z kostní dřeně. Břišní tyfus je typickým infekčním onemocněním v zemích se zhoršenou hygienickou úrovní (souvisí s kontaminací vodních zdrojů) [Votava *et al.*, 2003].

#### 2.3.1.2 Primárně zoopatogenní salmonely

Zoopatogenní salmonely jsou nejčastějším původcem střevních bakteriálních nákaz u nás. Jejich odolnost vůči zevním vlivům je poměrně velká. Často jsou tyto bakterie pohyblivé. Při nákaze jde většinou o klasickou střevní infekci bez komplikací. Charakteristické jsou průjemy, někdy zvracení a horečka. U malých dětí a u straších nebo oslabených osob hrozí salmonelová seps, která může být smrtelná. Jde o typickou fekálně-orální infekci. Jako vehikulum je vždy potřeba potravina.

Přenos z člověka na člověka je vzácný. Zdrojem infekce je většinou drůbež, hlavně vodní, kdy je velká pravděpodobnost nákazy od volně létajících ptáků [Votava *et al.*, 2003].

Salmonely tvoří laktázonegativní kolonie na Endově agaru. Ke stanovení salmonel se používá metoda ELISA. Ve srovnání s kulturační metodou je tato metoda rychlá, citlivá a specifická pro detekci *S. typhi* z potravin nebo vzorků vody. ELISA může být použita jako rychlý screening pro sledování životního prostředí [Kumar *et al.*, 2008].

### 2.3.2 *Shigella*

Jde o gramnegativní patogenní bakterie, které jsou nepohyblivé. Jsou fakultativně anaerobní, ale nejlépe rostou za aerobních podmínek. Z morfologického hlediska jsou shigely typickými enterobakteriemi. Z této skupiny jsou nejchoulostivější co do odolnosti. Do rodu *Shigella* patří čtyři druhy: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* a *Shigella boydii* [Hygienický význam..., 1979].

Shigely nacházíme pouze v gastrointestinálním traktu člověka a opic. Jediným důležitým infekčním zdrojem je tedy člověk; jde o čistě lidský patogen. *Shigella* je původcem bacilární úplavice (shigelózy). Některé kmeny *S. dysenterie* produkují tzv. shiga toxin, který má enterotoxické, neurotoxické a cytotoxické účinky. Úplavice se zřídka přenáší alimentárně, protože mikrob nemá schopnost se v potravinách příliš výrazně pomnožit. Přenáší se především špinavými rukama. V dnešní době je úplavice vzácnější než salmonelóza. Případné epidemie se mohou vyskytovat v prostředí sociálně nebo psychicky postižených osob [Votava *et al.*, 2003].

V diagnostice se uplatňuje metoda kultivace, biochemický průkaz a antigenní analýza. Pro detekci virulentní *Shigella spp.* v oblasti životního prostředí vzorků vod byla vyvinuta metoda rapid PCR [Theron *et al.*, 2001].



Obr.8 *Shigella flexneri*

### 2.3.3 *Vibrio*

Rod *Vibrio* zahrnuje více než šedesát druhů. Prokazatelně humánními patogeny je dvanáct z nich [Votava *et al.*, 2003]. *Vibria* jsou krátké gramnegativní obvykle lehce zakřivené tyčinky, čile pohyblivé, s jedním bičíkem. Mají většinou malé růstové nároky, snášejí dobře alkalické prostředí; jsou halofilní, v kyselém prostředí rychle hynou. Jsou velmi citlivá na zvýšenou teplotu a na desinfekční prostředky. Jsou fakultativně anaerobní. Kultivačně jde o velmi nenáročné bakterie. Rostou dobře i na chudých půdách za striktně aerobních podmínek [Hygienický význam...,1979].

*Vibria* jsou rozšířena ve vodním prostředí teplejších oblastí. Mohou způsobovat průjmy, infekce ran, uší a septikémie. Nejvýznamnějším onemocněním, které *vibria* způsobují je cholera [Votava *et al.*, 2003]. Rezervoárem vibríí v endemických oblastech jsou vodní toky a nádrže. Ve vodách mohou přežívat až několik let bez ztráty virulence. Ve stolici přežívají tři týdny, na předmětech několik dní a v ledu až šest týdnů. Onemocnění u lidí je spojené s požitím kontaminované vody či s konzumací kontaminovaných plodů moře. Vodní *vibria* mají význam při pátrání po zdroji cholerové infekce; od patogenních vibríí je možné je odlišit fermentací sacharidů nebo sérologicky [Hygienický význam..., 1979].

#### 2.3.3.1 *Vibrio cholerae*

Je původcem choleroových průjmů. Do Evropy byla cholera zavlečena z Indie. *Vibrio cholerae* požití s větším množstvím vody nebo potraviny je schopno překonat kyselé prostředí žaludku. Tato bakterie je toxická a neinvazivní. Klasická cholera (*cholera asiatica*) se projevuje jako prudká gastroenteritida s celkovou intoxikací organismu [Votava *et al.*, 2003].

Novou metodou stanovení vibríí je semi-nested PCR. Tato metoda zahrnuje kombinaci obohacení a rychlou přípravu vzorků a dává možnost rychlé detekce toxikogenní *V. cholerae* v environmentálních vzorcích vod [Theron *et al.*, 2000].



Obr.9 *Vibrio cholerae*



### 2.3.4 Legionella

Bakterie rodu *Legionella* jsou štíhlé pleomorfní tyčinky, často skoro vlákna. Jsou gramnegativní, barví se špatně, protože jejich stěny obsahují unikátní mastné kyseliny. Legionely se vyskytují v přírodním prostředí velmi často, vždy ve vodách. Odolávají poměrně vysokým teplotám i chlorovým desinfekčním prostředkům [Votava *et al.*, 2003].

Dva nové druhy legionel izoloval vyškovský mikrobiolog Vladimír Drašar. Jsou to *Legionella moravica* a *Legionella brunensis* [Wilkinson *et al.*, 1988].

Některé druhy legionel způsobují onemocnění dýchacích cest spojené s bolestmi hlavy, nevolností, horečkou a kašlem. Mohou způsobovat i zápal plic, průjmy, zvracení a bolesti břicha. Infekce se šíří vzduchem [Šilhánková, 2008]. Potenciálně patogenní jsou všechny legionely. Do organismu vstupují převážně inhalační cestou infikovaným aerosolem. Mezilidský přenos není možný [Votava *et al.*, 2003]. Většina legionelových infekcí pochází z infekce *Legionella pneumophila*. Infekce legionelóza má dvě klinické formy. Legionářská nemoc (pneumonie) se projevuje těžkým zápal plic. V plicních tkáních jsou mikroabscesy. Není-li rychle přistoupeno k léčbě, může být nemoc smrtelná. Více ohrožení jsou pacienti se sníženou imunitou, staří lidé, kuřáci a pacienti po transplantaci. Při onemocnění jsou poškozeny i ledviny, játra, centrální nervová soustava a gastrointestinální systém. Pontiacká horečka je druhá forma legionelózy. Provází ji zimnice, třesavky, teploty, bolesti svalů. Onemocnění trvá 2 - 5 dní a spontánně končí. Legionelové infekce jsou celosvětově rozšířené onemocnění [Votava *et al.*, 2003].

Legionely lze stanovit metodou přímého průkazu na mediu BCYE. V moči lze metodou ELISA zachytit legionelový antigen. Molekulárně-biologické metody zatím nejsou v praxi příliš využívány vzhledem k nízké citlivosti (díky inhibitorům v klinických vzorcích). Při stanovení legionel ve vodě je však možné použít metodu RT-PCR. Tato metoda je ve srovnání s kultivací (7 dní) mnohem rychlejší [Cooper *et al.*, 2009].



Obr. 10 *Legionella pneumophila*

### 2.3.5 *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou grampozitivní koky, uspořádané jednotlivě, v tetrádách, párech nebo ve velmi krátkých řetězcích. Nejčastěji se však vyskytují v nepravidelných shlucích tvaru hroznu. Jsou nepohyblivé a netvoří spory [Votava *et al.*, 2003].

Rod *Staphylococcus* má vedle aerobního metabolismu i metabolismus anaerobní, takže jsou tyto koky schopné zkvašovat cukry za tvorby kyselin. Stafylokoky tvoří žluté až oranžové kolonie (některé kmeny tvoří i kolonie bílé). Nejčastěji se vyskytují na kůži a u teplotkrevných zvířat a člověka i na mukózních membránách, např. v nosní dutině. Je hostitelem řady bakteriofágů [Šilhánková, 2008].

Zatímco původně se rozeznávaly jen dva druhy stafylokoků – *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*, existuje nyní (r. 2003) 47 různých stafylokoků. Tuto skupinu lze rozdělit podle jejich schopnosti koagulovat plasmu na koagulázapozitivní a koagulázanegativní stafylokoky [Votava *et al.*, 2003]. V taxonomii stafylokoků vynikl prof. Václav Hájek z Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Stafylokoky jsou růstově málo nároční, patří k odolným mikroorganismům. Odolávají vyschnutí (v hnisu) i zářevu kolem 60°C. Stafylokoky jsou odolné vůči fenolu a sloučeninám rtuti. Alkohol je nehubí, jen „konzervuje“. Jsou ale citlivější vůči nenasyceným mastným kyselinám a bazickým barvivům. Dobře rostou při velkém teplotním rozmezí (10 – 42°C) a dobře snášejí přídavek NaCl v kultivační půdě. Stafylokoky jsou rezistentní vůči chlorovým preparátům; patří mezi jedny z nejodolnějších nesporelujících mikroorganismů [Hygienický význam..., 1979]. Některé druhy rodu *Staphylococcus* produkují enterotoxiny, tím se stávají pro organismus nebezpečnými – mohou způsobit vážné otravy, někdy až smrtelné. Některé z toxinů se inaktivují delším varem [Panneerseelan a Muriana, 2009].

Stanovení výskytu stafylokoků je určeno především ke kontrole jakosti desinfekčního účinku chloru ve vodě plaveckých bazénů a koupališť, neboť stafylokoky jsou podstatně více rezistentní než ostatní indikátorové mikroorganismy. Sleduje se hlavně výskyt hemolytických stafylokoků. Kultivačním médiem je telurito-vaječný agar, krevní agar s NaCl a Ester-Faulconnerův agar. Při kultivaci se sleduje průběh hemolýzy. Počet vyrostlých kolonií vykazujících hemolýzu na krevním agaru a zkvašování mannitu se současnou koagulací plasmy se přepočítává na 100 ml vzorku vody. Výskyt stafylokoků ve vodách všech typů je nutno klasifikovat jako hrubou hygienickou závadu [Hygienický význam..., 1979].



Pro detekci toxinů SEA a SEB v potravinách bylo zavedeno imunomagnetické PCR zesílení signálu metodou iPCR-SA [Panneerseelan a Muriana 2009].

### 2.3.5.1 *Staphylococcus aureus*

Jde o častý lidský patogen. Přirozeně se vyskytuje na kůži a sliznicích lidí, přičemž nevyvolává žádné potíže. Jakákoliv změna – porucha – přirozené imunity, může mít za následek vážné onemocnění. Infekce se může projevit jako banální hnisavé afekty na kůži, ale také jako záněty vnitřních orgánů, které mohou vést až ke smrtelné sepsi. Kromě těchto hnisavých onemocnění, může *Staphylococcus aureus* vyvolat i otravy z potravin, tedy i z vody. Stafylokokové toxiny jsou vysoce termostabilní molekuly, které snesou var až půl hodiny a odolávají účinkům trávicích enzymů. Vyvolávají zvracení a průjem [Votava *et al.*, 2003].



Obr.11 *Staphylococcus aureus*

### 2.3.5.2 *Staphylococcus epidermis*

Je zástupce skupiny koagulázanegativních stafylokoků. U zdravého hostitele vyvolávají infekce jen vzácně. Rizikovou skupinou jsou intravenózní narkomani, nezralí novorozenci a pacienti s implantáty. Nejčastějším onemocněním jsou infekce krevního řečiště, projevující se bakteriemií. Koagulázanegativní stafylokoky bývají odolné na běžná protistafylokoková antibiotika [Votava *et al.*, 2003].

### 2.3.6 *Streptococcus*

Do rodu *Streptococcus* patří fakultativně anaerobní grampozitivní katalázanegativní koky, které se shlukují do dvojic až řetízků; jsou nepohyblivé. Jejich kolonie jsou velmi drobné. Patří sem jak druhy obligátně patogenní, tak i příslušníci normální mikroflóry sliznic lidí a zvířat [Votava *et al.*, 2003]. Patogenní druhy rodu *Streptococcus* způsobují hnisavá onemocnění, spálu, angínu, zubní kazy, apod. [Šilhánková, 2008].

Patogenní druhy tvoří enzymy, které rozkládají červené krvinky a způsobují tak hemolýzu. Částečný rozklad, který se na krevním agaru projeví zelenými zónami kolem kolonií, se označuje jako  $\alpha$ -hemolýza. Úplný rozklad, projevující se jasnými zónami kolem kolonií se nazývá  $\beta$ -hemolýza. Jako  $\gamma$ -reakce se označuje situace, kdy k rozkladu nedochází vůbec [Šilhánková, 2008]. Úplnou hemolýzu způsobuje *Streptococcus pyogenes*, částečná hemolýza je typická pro *Streptococcus pneumoniae* [Votava *et al.*, 2003].

$\alpha$ -, i  $\beta$ -hemolytické streptokoky jsou dost rezistentní vůči chloru ve vodě, a proto snadno přežívají ve vodách bazénů a koupališť, které jsou znečištěné sekrety sliznic dýchacích cest. Tyto streptokoky jsou považovány za indikátory závažného hygienického znečištění vod v plaveckých bazénech a na koupalištích. Na jiných lokalitách se jejich stanovení provádí jen v odůvodněných případech [Hygienický význam..., 1979].

Kultivačním médiem pro stanovení streptokoků je agarové medium dle Haase a krevní agar. Po kultivaci se zvlášť odečítají kolonie tvořící  $\alpha$ -hemolýzu (zelené) a zvlášť nezbarvené kolonie s čistou aureolou ( $\beta$ -hemolýza) [Votava *et al.*, 2003]. Z nových metod detekce lze pro stanovení různých sérotypů streptokoků použít metodu sekvenční multiplex PCR [Antonio *et al.*, 2009].

Z rodu *Streptococcus* byly vyčleněny nehomolyzující nepatogenní kmeny, které se používají v mlékárenství. Tyto druhy byly zařazeny do nově vytvořeného rodu *Lactococcus*. Nejvýznamnější je *Lactococcus lactis* [Šilhánková, 2008].

#### 2.3.6.1 $\alpha$ -hemolytické streptokoky – viridující

Do skupiny  $\alpha$ -hemolytických streptokoků se řadí *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus bovis* a *Streptococcus suis*. Dále sem patří řada druhů tzv. ústních (orálních) streptokoků.

##### *Streptococcus pneumoniae*

Jde o grampozitivní opouzdřený kok ovoidního tvaru. Na vlhkých obohacených půdách vyrůstá pneumokok v hlenovitých bezbarvých koloniích připomínajících tvarem kapku oleje [Hygienický

význam..., 1979]. Pneumokoky jsou přítomné v nosohltanu nejméně u 10% zdravých dospělých. Jsou hlavním původcem komunitního zánětu plic. Pneumokok je také nejčastější příčinou meningitidy u osob starších 60 let. Častý je pneumokokový zánět mozkových blan po úrazech hlavy a akutní zánět středního ucha.

Zdrojem pneumokokových infekcí je člověk, i když vzácně může *Streptococcus pneumoniae* vyvolat infekce i u zvířat. Dříve byl pneumokok citlivý na většinu antibiotik, nyní se ale ve světě objevují kmeny rezistentní na penicilin [Votava *et al.*, 2003].

### 2.3.6.2 $\beta$ -hemolytické streptokoky – pyogenní

Z této skupiny jsou pro člověka z hlediska patogenity významné dva druhy – *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus agalactiae*.

#### *Streptococcus pyogenes*

Je jedním z nejvíce patogenních druhů rodu *Streptococcus*. Působí hnisavé infekce hltanu a kůže. Je schopný vyvolat i celkové onemocnění. *Streptococcus pyogenes* je kultivačně poměrně náročný; vyžaduje živné půdy obohacené krví. Na obyčejném agaru roste špatně. Kolonie jsou drobné a bývají obklopeny ohraničenou zónou  $\beta$ -hemolýzy. Hemolýzu potlačuje přítomnost redukujících sacharidů v mediu. Důležitým faktorem virulence je pouzdro z hyaluronové kyseliny [Votava *et al.*, 2003].

Nejběžnějším onemocněním způsobeným *Streptococcus pyogenes* je angína. Při nákaze kmeny, produkujícími exotoxiny se k příznakům angíny přidává vyrážka a zčervenání jazyka – spála. Mezi pozdní následky streptokokových infekcí patří revmatická horečka. Stanovení streptokoků se provádí metodou membránových filtrů na krevním agaru. Moderní metodou stanovení *Streptococcus pyogenes* je metoda real-time PCR. Ve srovnání s tradiční kultivační metodou, je novější metoda časově výhodnější [Dawson *et al.*, 2009].



Obr. 12 *Streptococcus*

### 2.3.7 *Aeromonas*

Rod *Aeromonas* je druhým rodem čeledi *Vibrionaceae* a obsahuje druhy *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas punctata* a *Aeromonas salmonicida*. Aeromonády svými biochemickými, růstovými a morfologickými vlastnostmi ukazují na příbuznost s vibrií [Hygienický význam..., 1979]. Jsou to krátké přímé tyčinky se zaoblenými konci. Jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní a jsou rezistentní k vibriostatikům. Jsou to nenáročné, odolné mikroorganismy, které dobře rostou na rutinních základních a selektivně-diagnostických půdách. Od enterobakterií se liší produkcí oxidázy; jsou katalázapozitivní [Votava *et al.*, 2003].

Při mikrobiologickém rozboru tvoří aeromonády určité procento kolonií na Endově agaru s koliformními bakteriemi. K odlišení se používá cytochromoxidázový test. Ve vodním prostředí při stanovení indikátorů fekálního znečištění bývají aeromonády velmi často příčinou hrubých chyb, neboť jejich kolonie se snadno s koliformními zaměňují [Hygienický význam..., 1979]. Pro detekci *Aeromonas hydrophila* lze použít metodu polymerázové řetězové reakce PCR. Tato metoda má uplatnění jako druh rychlého testu specifické virulence [Baloda *et al.*, 1995].

Aeromonády jsou většinou vodní mikroorganismy. Lze je rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří většinou nepohyblivé organismy, které mají optimum růstu kolem 6 – 10°C. Tato skupina je značně nehomogenní. Jsou rozšířené ve sladkých vodách, kde způsobují onemocnění lososovitých ryb. Druhá skupina je tvořena mezofilními pohyblivými mikroorganismy, které bývají často izolovány z klinického materiálu. Aeromonády lze dále izolovat z masa, mléka, zeleniny, ze všech typů vod, z vodovodních kohoutků, výlevků i z rozvodů destilované vody [Hygienický význam..., 1979].



Obr. 13 *Aeromonas*

### 2.3.8 *Candida*

Kvasinky *Candida* se nazývají nepravými kvasinkami, protože nevytvářejí vřecko s askosporami. Rozmnožují se formou blastospor. Buňky jsou sférické až ovoidní [Šilhánková, 2008].

Rod *Candida* obsahuje na 160 druhů. Zahrnuje nekvasící druhy i druhy se silnými kvasnými schopnostmi. Na vhodných půdách tvoří pseudomycelium až pravé mycelium. Některé druhy slouží k přípravě krmného droždí. Celá řada druhů je ale pro člověka fakultativně patogenní; způsobují onemocnění kandidózu, která se projevuje jako kožní onemocnění (postihuje nehty, mezprstní plochy). Dále jsou kvasinky *Candida* původci chorob sliznic dýchacího, zažívacího a urogenitálního systému. V případě snížené imunity mohou kandidy napadnout kterýkoliv orgán. Vyskytují se i jako sekundární onemocnění (cukrovka, AIDS, TBC, aj.) [Votava *et al.*, 2003].

Nález kvasinek *Candida* ve vodách plaveckých bazénů je indikátorem hrubých hygienických závad. Zdrojem infekce nemusí být jen voda, ale i dřevěné či umělohmotné rošty, rohože a podlahy v přilehlých prostorách bazénů (sauna, sprchy, atd.). Kandidy jsou vysoce rezistentní vůči chlorovým i ostatním desinfekčním prostředkům [Votava *et al.*, 2003].

Kandidy se stanovují jednoduchou (ale již zastaralou) metodou membránových filtrů. Kultivačním médiem je Vitézovo agarové medium a základní tekuté medium pro fermentaci cukrů. Jako výsledek se udává počet kolonií, potvrzený mikroskopicky a testem fermentace glukózy, sacharózy a maltózy, na zpracovaných objem vzorku [Hygienický význam...,1979]. Další metodou detekce kandid je metoda PCR. I když jsou standardní metody pro diagnostiku i nadále nezbytné, umožňuje PCR stanovení výsledků přibližně o tři dny dříve [Wellinghausen *et al.*, 2009].

#### 2.3.8.1 *Candida albicans*

Nejvíce patogenní druh rodu *Candida*. Často bývá izolován z klinického materiálu. U většiny jedinců jsou přítomny v zažívacím traktu a v pochvě, aniž by vyvolávaly chorobné příznaky. Nejčastějším projevem onemocnění je moučnivka. Na kůži se *Candida albicans* uplatňuje v místech vlhkého zapaření (Votava *et al.*, 2003).



Obr. 14 *Candida albicans*

### 2.3.9 Leptospiry

Patří mezi spirochéty. Leptospiry se vyznačují spirálovitým tvarem, mají 12–18 pravidelných vinutí a na koncích jsou zahnuté v charakteristické háčky; jsou živě pohyblivé [Hygienický význam..., 1979]. Rod *Leptospira* lze rozdělit na dva druhy. Nepatogenní *Leptospira biflexa* a *Leptospira interrogans*, zahrnující všechny patogenní kmeny [Votava *et al.*, 2003].

Leptospiry se množí aerobně při 28 – 30°C v Ringerově roztoku. Mají pozitivní oxidázovou a katalázovou reakci, ale v jejich diagnostice nemají biochemické reakce význam [Hygienický význam...,1979]. Leptospiry jsou poměrně odolné; ve vlhkém prostředí mohou přežívat až několik měsíců. V kontaminovaném prostředí vydrží jen při snížené teplotě [Votava *et al.*, 2003]. *Leptospira biflexa* je častý saprofyt i ve vodovodní vodě. Má některé antigeny společné s patogenními leptospirami. Proto se hodí k typově nespecifické diagnostice leptospir [Hygienický význam..., 1979].

Leptospiroza je antropozoonóza vyvolaná některými zástupci rodu *Leptospira*. Největším zdrojem leptospir jsou krysy, potkani a polní myši. Kontaminují vodu leptospirami vyloučenými močí. Infikovaná však mohou být i domácí zvířata (kůň, prase) [Hygienický význam..., 1979]. K infekci většinou dochází při koupání nebo pití z přírodního zdroje. Nebezpečí onemocnění stoupá při přírodních katastrofách (záplavy). Příznaky leptospirozy jsou podobné chřipce, ale mohou mít i vážnější průběh jako meningitida, žloutenka, selhání ledvin a šok [Votava *et al.*, 2003]. Leptospirozy jsou i jedním z tzv. profesionálních onemocnění. Postihují čističe kanálů, zemědělce, pracovníky na jatkách, apod [Hygienický význam..., 1979].

Leptospiry lze kultivovat v tekutém mediu. Vyšetření PCR se zatím rutinně neprovádí, protože nejsou dostatečné zkušenosti. Multiplex polymerázová řetězová reakce byla vyvinuta pro diagnostiku leptospiroz a pro rozlišování patogenních a saprofytických leptospir [Kositanont *et al.*, 2007]. V hygienické analýze vody se průkaz leptospir běžně neprovádí, ale např. při koupání musíme brát možnost jejich výskytu na zřetel [Hygienický význam..., 1979].



Obr. 15 *Leptospira*

### 2.3.10 Enteroviry

Jde o živočišné viry, které mají schopnost se množit ve střevech. Enteroviry jsou odolné vůči zevnímu prostředí. Virion obsahuje jednořetězcovou molekulu RNA [Šilhánková, 2008].

Do rodu *Enterovirus* patří druhy, které jsou rozšířené po celé zeměkouli [Votava *et al.*, 2003]. Vzhledem k rozšíření, typickému množení, značné odolnosti a vylučování ve stolici jsou tyto viry patogenní pro člověka nejčastějšími kontaminanty vody [Hygienický význam..., 1979]. Vedle *poliovirů*, způsobujících dětskou obrnu patří mezi enteroviry také *Coxsackieviry* a *Echoviry*, které způsobují střevní onemocnění přenášená potravinami (cyklus fekálie – ústa) [Šilhánková, 2008].

Ke stanovení enterovirů lze použít metody real-time NASBA a RT-PCR. Bylo zjištěno, že real-time NASBA test je méně citlivý než RT-PCR [Rutjes *et al.*, 2005].

#### 2.3.10.1 Polioviry

Z lidských enterovirů se vyznačují největší neurovirulencí. Mohou způsobit přenosnou dětskou obrnu [Votava *et al.*, 2003]. Viry se vylučují stolicí nemocného člověka a šíří se při nedostatečné hygieně kontaminovanou vodou nebo potravinami. Existuje i kapénkový způsob nákazy [Šilhánková, 2008]. Se stoupající hygienickou úrovní se snížil kontakt lidí (hlavně dětí) s polioviry. Od šedesátých let se úspěšně očkuje proti přenosné dětské obrně [Votava *et al.*, 2003]. Zdrojem infekce je pouze člověk.

#### 2.3.10.2 Coxsackieviry

Jsou polytrofní, tzn., že vyvolávají u člověka různá klinická onemocnění. Často se nachází v zažívacím traktu bez jakýchkoliv příznaků. Coxsackievirózy se vyskytují po celém světě, především v letním období. Zdrojem infekce jsou hlavně děti. Coxsackieviry se přenášejí fekálně-orální cestou, nosičem nákazy bývá kontaminovaná voda [Votava *et al.*, 2003]. Nemoc rukou, nohou a úst je běžné virové onemocnění dětí. Je provázeno horečkou a tvorbou aft v ústech i na kůži.

### 2.3.10.3 Echoviry

Původně byly izolovány od zdravých osob. Mohou být příčinou aseptických meningitid, lehkých respiračních a střevních onemocnění. Jen výjimečně působí vážná onemocnění [Votava *et al.*, 2003]. Zdrojem infekce je člověk. Přenos se děje kontaminovanou vodou při koupání.

Vzhledem k výraznému pokroku ve vývoji detekčních metod, se v následující části práce zaměřím na molekulárně-genetické metody využitelné pro výzkum patogenních mikroorganismů.



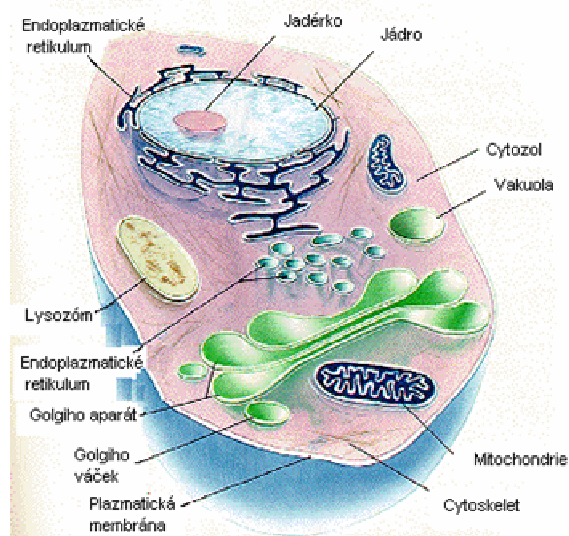
### 3. ZÁKLADY GENETIKY

Název genetika pochází z latinského slova *genus* – rod. Tento termín zavedl v roce 1906 William Bateson [Kočárek, 2004]. Počátky genetiky lze hledat již ve středověku a v antice; nikdo ale nedokázal vysvětlit pravidla přenosu genetických znaků. Až po roce 1900 byla potvrzena správnost Mendelových pokusů a tím položeny základy moderní genetiky. K výraznému pokroku pak došlo ve 2. polovině 20. století, v návaznosti na přelomovou práci Watsona a Cricka (1953), kteří popsali strukturu DNA [Watson a Crick, 1953]. S rozvojem znalostí docházelo také k výraznému zvýšení metod využitelných ke studiu molekulárně-genetických vlastností živých organismů a tím také k rozšiřování jejich aplikační sféry.

#### 3.1 Buňka

Již v roce 1665 pozoroval Robert Hooke buněčnou stěnu odumřelých buněk korku. Zanedlouho poté, v roce 1774, pozoroval holandský obchodník Anthony von Leeuwenhoek bakterie a prvoky. Postupem času vznikla buněčná teorie, která říká, že buňka je základní stavební a funkční jednotkou všech živých soustav. Některé organismy (bakterie, sinice, houby či prvoci) jsou tvořeny pouze jedinou buňkou, která zajišťuje všechny potřebné funkce. Nejmenšími buňkami jsou bakterie, měří asi 0,5  $\mu\text{m}$  [Závodská, 2006].

Každá buňka pochází z buňky – *Omnis cellula e cellula* – to jsou slova zakladatele vědecké patologie Rudolpha Virchova. Objev buněčného dělení vedl k objevu chromozomů [Kočárek, 2004].

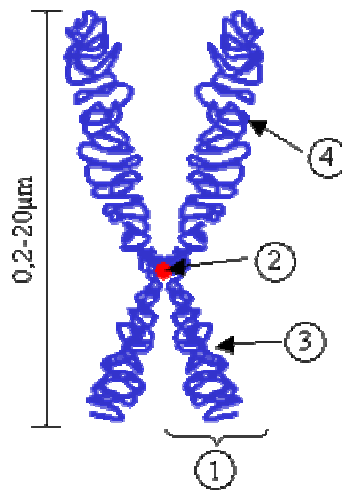


Obr. 16 Stavba buňky

### 3.1.1 Chromozom

Chromozom je specifická barvitelná buněčná struktura eukaryot přítomná v jádře. Skládá se z DNA a histonů. Existence chromozomů usnadňuje rozdělení genetické informace do dceřiných buněk. Soubor všech chromozomů v jádře se nazývá karyotyp [Rosypal, 1998]. Poprvé chromozomy pozoroval a popsal Karl Wilhelm von Nägeli v roce 1842. To, že chromozomy nesou genetickou informaci dokázal Thomas Morgan [Sturtevant, 1946].

Morfologii těla řádně spiralizovaného chromozomu lze nejlépe pozorovat ve stadiu anafáze. Chromozom je pentlicovitý útvar, tvořený dvěma chromatidami, které jsou propojeny centromerou [Závodská, 2006].

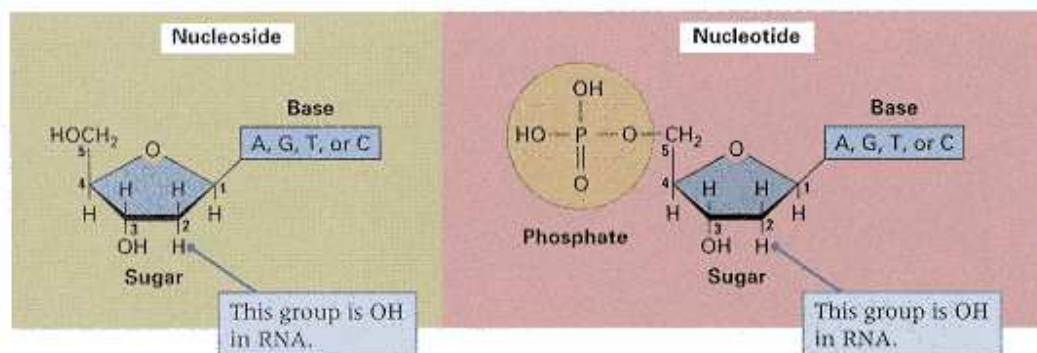


Obr. 17 Chromozóm (1-chromatida, 2-centromera, 3-krátké rameno chromatidy, 4-dlouhé rameno chromatidy)

### 3.1.2 DNA

Důležitou složkou všech chromozomů je molekula deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Je to nukleová kyselina, která je nositelem genetických informací téměř všech organismů [Kočárek, 2004]. U eukaryot je uvnitř buněčného jádra, u prokaryot se nachází volně v cytoplasmě [Alberts, 2008]. DNA je biologická makromolekula tvořená dvěma řetězci nukleotidů. Nukleotid se skládá ze tří složek – fosfát, deoxyribóza a nukleová báze [Hartl a Jones, 1998]. Genetická informace se v DNA kóduje pomocí genetického kódu, který jednotlivým tripletům přiřazuje v procesu translace aminokyseliny [Barbieri, 2006].

Veškerá genetická informace uložená v DNA se nazývá genom. Zahrnuje všechny geny a nekódující sekvence. Sekvence DNA (genetická sekvence) je posloupnost „písmen“, představující primární strukturu molekuly DNA. Tato „písmena“ jsou tvořeny jednotlivými nukleotidy. Jedná se o thymin, adenin, cytosin a guanin. Vzhledem k biologickým funkcím je možné rozlišit sekvence kódující a nekódující [Alberts, 2008].



obr. 18 nukleosid, nukleotid

#### 3.1.2.1 Význam DNA v praxi

V moderní kriminalistice je DNA využívána jako nástroj k určení totožnosti – například při testech paternity nebo tzv. *fingerprinting* (genetická daktyloskopie). Je to metoda forenzní chemie, umožňující určit, zda daný úsek DNA patří konkrétnímu hledanému člověku. Polymorfismus významný pro genetickou daktyloskopii se nachází v junk-DNA (úseky DNA, které nemají žádnou funkci). Forenzní analýza pátrá po opakujících se sekvencích [Alberts, 2008]. Další významnou metodou je nepřímá DNA-diagnostika, často využívaná v klinické genetice. V případě, že nelze určit mutaci genu, která je zodpovědná za vznik choroby, je možné vyšetřit některé

polymorfni oblasti, které se nachází v blízkosti postiženého genu [Kočárek,2004]. Znalosti DNA se také využívá při detekci nejrůznějších patogenů pomocí molekulárně-biologických metod.

### 3.1.2.2 Replikace DNA

Jde o proces zdvojení molekuly DNA. Předchází každému buněčnému dělení a právě replikace DNA je schopnost zajišťující dědičnost [Kočárek, 2004]. V každém kole replikace jsou oba řetězce DNA použity jako templáty pro syntézu komplementárního vlákna. Nejdůležitějším enzymem replikačního procesu je DNA-polymeráza, syntetizující nové vlákno DNA podle původního řetězce [Alberts, 2008]. Tento enzym pak v moderních molekulárních metodách slouží jako prostředek ke kopírování vybraných úseků DNA.

### 3.1.2.3 Transkripce DNA

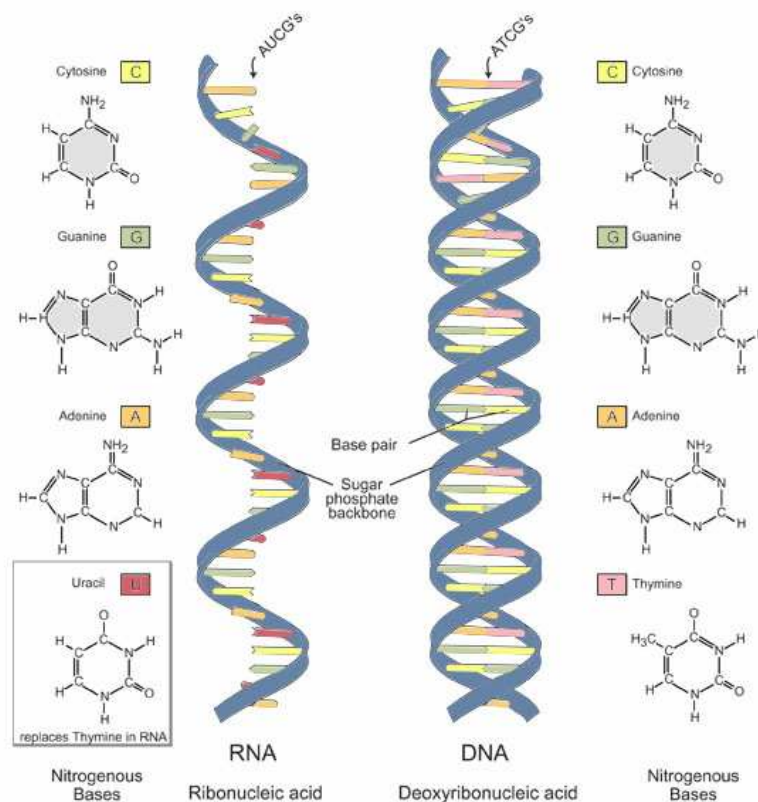
Transkripce je proces, při němž je informace uložená v DNA přepsána do struktury mRNA (mediátorové RNA) [Rosypal, 1998]. Kromě procesu transkripce existuje také proces, při kterém dochází k přepisu genetické informace z RNA do DNA. Tento se nazývá reverzní transkripce. Jde o obrácený postup, než jaký probíhá ve většině případů přenosu genetického kódu. Schopnost reverzní transkripce mají retroviry, u kterých je proces podporován reverzní transkriptázou [Kočárek, 2004]. Pomocí reverzní transkripce dochází k úpravě genetického kódu a napadená buňka (i její potomci) provádí jinou činnost než je obvyklé.

### 3.1.2.4 Denaturace

Působením zvýšené teploty nebo chemických vlivů dochází k denaturaci DNA – oddělení komplementárních řetězců. Renaturaci (zpětné připojení komplementárních řetězců) lze navodit snížením teploty nebo změnou chemického roztoku [Alberts, 2008]. Na principu denaturace a renaturace DNA je založena například molekulárně-biologická metoda zvaná hybridizace. Slouží k identifikaci částí genomu, pomocí uměle připravených komplementárních úseků DNA. Metoda se využívá v diagnostice lidských chorob, popřípadě k detekci přítomnosti virů v buňkách pacienta [Kočárek, 2004].

### 3.1.3 RNA

RNA je nukleová kyselina, která se skládá z vlákna kovalentně navázaných nukleotidů. Od DNA se liší přítomností hydroxylové skupiny a využitím nukleové báze uracilu místo thyminu [Watson, 1982]. V těle má RNA mnoho funkcí. Podle funkce rozlišujeme: mRNA (mediátorová) - vzniká transkripcí DNA a přenáší genetickou informaci; tRNA (transferová) - zajišťuje transport aminokyselin k ribozómu; rRNA (ribosomální) - stavební funkce v ribozómu; miRNA (microRNA) - má za úkol genovou expresi některých genů [Alberts, 2008].



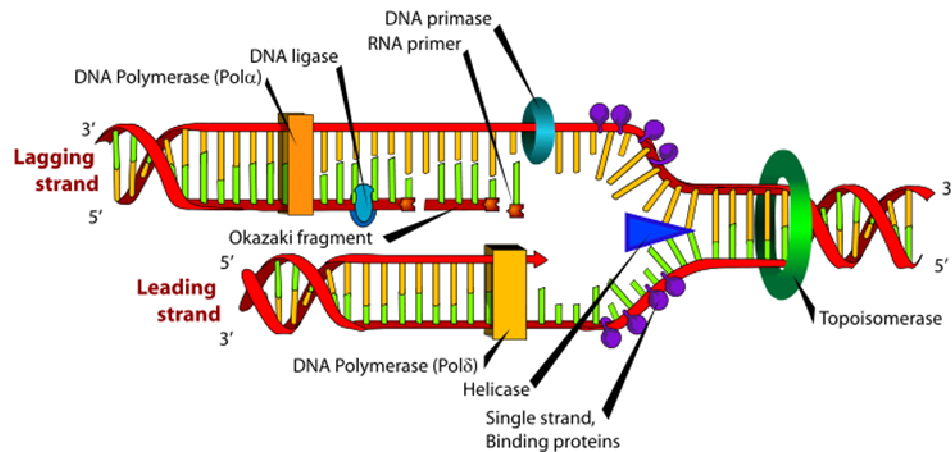
Obr. 19 Struktura nukleových kyselin DNA a RNA

### 3.1.4 Genetické změny

Vlivem prostředí, působením chemických látek nebo záření může docházet ke genetickým změnám nazývaným mutace. Mutace je proces, který způsobuje dědičné změny v genu [Hartl a Jones, 1998]. Mohou být příčinou patologických stavů nebo mohou umožňovat získání inovované vylepšené funkce. Díky těmto mutacím vzniká genetická různorodost populace a jsou také motorem evoluce člověka [Sršeň a Sršňová, 2005]. Některé mutace vznikají náhodně (spontánní mutace), např. chybou při replikaci. Většinou ale jde o následek působení chemických látek, virů nebo fyzikálních faktorů, označovaných jako mutageny [Kočárek, 2004; 2008]. Jako mutagenní lze označit všechny vlivy, které mění strukturu DNA. Změna DNA může být velká, (ztráta nebo strukturní přestavba chromozomů) nebo bodová (změna malého úseku DNA). Následkem mutace dochází k poškození genu, který je potom buď zcela nefunkční, nebo řídí syntézu defektního proteinu [Kočárek, 2004]. Podle místa mutace lze rozlišit mutaci genovou, chromozómovou a genomovou [Sršeň a Sršňová, 2005]. Působením mutací vznikají nové formy genu, které ovlivňují projev příslušného znaku [Kočárek, 2008].

Mnohé mutace jsou škodlivé, protože způsobují závažná onemocnění, vývojové vady, poruchy metabolismu, aj. Jsou popsány i tzv. letální mutace, které jsou příčinou úmrtí jedince ještě ve stadiu embrya nebo plodu [Kočárek, 2008]. Jestliže buňka vlivem mutace ztrácí schopnost regulace buněčného dělení, může neomezeně a nekontrolovatelně růst, což má za následek vznik nádoru [Alberts, 1998]. Ne všechny mutace však mají negativní následky. Buď se vůbec nemusí projevit, nebo je jejich důsledek dokonce pro organismus pozitivní, neboť může zvýšit životaschopnost jedince. Takové mutace se uplatňují při evoluci organismů [Kočárek, 2008].

Mutace je významným zdrojem variability. Variabilita je jedním z typických znaků živého organismu [Kočárek, 2004]. Působením mutací vznikají nové alely, které ovlivňují podobu nového znaku. Alela je konkrétní forma genu. Každý gen může mít několik forem – alel. Jednotlivé alely se mohou projevovat nezávisle, nebo si mohou navzájem potlačovat, podporovat či měnit svůj fenotypový projev. Širší variabilita potomstva může mít velký význam pro jeho přežití a následný vývoj [Kočárek, 2008].



Obr. 20 Schéma replikace DNA

### 3.1.5 Variabilita DNA

Jde o vzájemnou odlišnost jedinců jednoho druhu. Proměnlivost je podmíněna vlivem vnějšího prostředí i genetickými faktory [Kočárek, 2004]. Významným zdrojem variability jsou mutace. Působením mutací vznikají nové alely daného genu, ovlivňující podobu daného znaku [Rosypal, 1998]. Příkladem běžné variability jsou např. tyto znaky: výška, inteligence, sexuální preference nebo osobnostní typ; u mikroorganismů pak například rezistence k antibiotikům (Hartl a Jones, 1998).

### 3.1.6 Mikrosatelity

Mikrosatelity (STRs – short tandem repeats) jsou sekvence DNA, které jsou složeny z opakujících se motivů o 1 – 6 nukleotidů. Bývají součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu [Weising *et al.*, 1995]. Častěji se tato polymorfní místa vyskytují v nekódujících oblastech. Podle složení je možno mikrosatelity rozdělit na dokonalé, nedokonalé a složené. K mikrosatelitům přilehlé oblasti jsou unikátní. To umožňuje navrhnout primery, které mohou daný marker vyhledat.

### 3.1.7 Minisatelity

Typ polymorfismu, který byl objeven v sekvenci DNA během vývoje PCR. Minisatelity jsou ohraničené oblasti DNA, vyznačující se variabilitou počtu opakujících se nukleotidových sekvencí. Minisatelity lze použít při hledání genetických markerů asociovaných s fenotypovými vlastnostmi a také při testech paternity [Stein *et al.*, 1996].

### 3.1.8 Bodové mutace

Jsou to jednoduché mutace, při kterých se jedna ze čtyř bází tvořící DNA změní v jinou. Bodové mutace jsou často způsobeny mutagenními chemikáliemi (kyslíkové radikály, těžké kovy, dehet) [Kulička, 2008]. Při vzniku bodové mutace dochází při přepisu genetické informace ke změně jednoho tripletu nukleotidů. Tím může být do bílkovinného řetězce zařazena jiná aminokyselina. Vzniklými zásahy se gen stává buď zcela nefunkčním, nebo vznikne jiná alela. Poškození, způsobené bodovou mutací se projeví jen tehdy, pokud je vlastní opravný systém buňky neopraví [Alberts, 2008]. Důsledky mutací mohou být nulové, ale také velmi vážné.



## 4 METODA PCR

Metoda PCR (polymerázová řetězová reakce, polymerase chain reaction) byla objevena v roce 1983. O významu objevu vypovídá fakt, že její objevitel Kary Mullis byl za tento objev v roce 1993 vyznamenán Nobelovou cenou za chemii. Tato metoda následně umožnila významné pokroky v oboru genetiky a nahradila do té doby využívané a neefektivní technologie. PCR probíhá *in vitro* [Alberts, 2008].

### 4.1 Historie PCR

Polymerázová řetězová reakce byla jako laboratorní technika koncipována v laboratořích Cetus Corporation v Kalifornii Kary Mullisem v roce 1983 [Rabinow, 1996]. Chronologicky první publikací o PCR se stala práce *Enzymatic Amplification of Beta-globin Genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia* z roku 1986 [Saiki *et al.*, 1986]. V roce 1986 Kary Mullis Cetus Corporation opustil; obdržel za svůj objev prémii 10.000 USD, což byla v historii firmy nejvyšší prémie vyplacená vědeckému pracovníkovi. V následujících pěti letech je Mullis uváděn jako první autor na všech publikacích výzkumného kolektivu Cetus, týkajících se techniky PCR [Rabinow, 1996].



obr. 21 Kary Mullis

## 4.2 Princip metody PCR

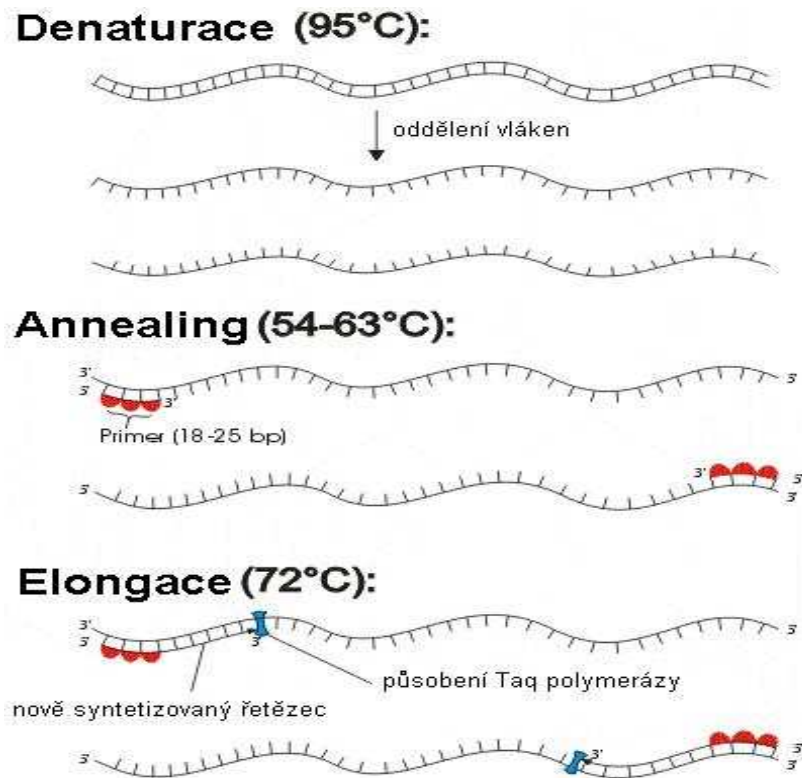
PCR metoda je založena na použití DNA-polymerázy, na její schopnosti syntetizovat novou oblast DNA, komplementární k šabloně [Alberts, 2008]. DNA-polymeráza je významnou složkou komplexu enzymů, který katalyzuje replikaci DNA [Rosypal, 1998]. Na konci PCR je konkrétní sekvence „namnožená“ v miliardách kopií (amplikonů) [Alberts, 2008]. Technika amplifikuje specifickou sekvenci DNA, jež je ohraničena pomocí speciálních sond tzv. primerů. Primer je řetězec o několika bázích, který označuje počáteční místo replikace DNA. Bez primeru by enzym DNA-polymeráza nebyl schopen začít syntézu nového řetězce. Pro polymerázovou řetězovou reakci se nejčastěji využívají syntetické primery. Jsou to oligonukleotidy, které jsou komplementární k cílovému místu DNA [Hartl a Jones, 1998].

V případě infekčního agens se jedná o namnožení druhově (popř. rodově) specifického úseku nukleové kyseliny. Je důležité, aby tento úsek byl neměnný, tj. aby v něm nedocházelo k bodovým mutacím [Pavlík, 1999].

DNA, např. uvolněná z infekčního agens, je nejprve tepelně denaturována. Při teplotě nad 90°C jsou rozvolněny vodíkové můstky, které spojují pyrimidinové a purinové báze vzájemně komplementárních nukleotidů. Tím jsou od sebe jednotlivé řetězce DNA odděleny. Výsledkem je jednořetězcová DNA (ssDNA; single strand DNA). Ta slouží v další fázi jako matrix pro syntézu nového komplementárního řetězce [Kočárek, 2004]. Následuje hybridizace primerů, tj. nasednutí primeru na sekvenci matricového řetězce. Místa vazby primerů vymezují oblast genomu, která bude amplifikována. Tato reakce probíhá při teplotě kolem 60°C [Hartl a Jones, 1998]. Dále probíhá elongace (prodlužování) nukleotidových řetězců, působením DNA-polymerázy při teplotě 72°C a vytváří se tak základ budoucího fragmentu DNA, který chceme získat [Kočárek, 2004]. Jednotlivé nukleotidy jsou řazeny podle komplementarity bází. Polymeráza zajišťuje propojení cukrů fosfodiesterickou vazbou do páteřního řetězce. Výsledkem procesu je úsek dvouřetězcové DNA, tzv. amplikon. Protože se amplifikují oba řetězce matricové DNA, vznikají v průběhu cyklu z jedné výchozí molekuly dva amplikony [Pavlík, 1999].

Druhý cyklus opět začíná tepelnou denaturací amplikonů, následuje nasednutí (annealing) primerů a polymerace (elongace) řetězců. Ze dvou výchozích molekul, tak vzniknou další čtyři amplikony [Kočárek, 2004]. Při každém dalším cyklu se počet amplikonů zdvojnásobuje. Z jediné molekuly, která vstoupí do reakce vznikne během třiceti cyklů až 1.073.741.824 amplikonů. Amplifikační profil PCR je určován empiricky. Kromě počtu cyklů zahrnuje i teplotní a časové údaje pro průběh jednotlivých fází cyklu. Časové údaje pro jednotlivé fáze výrazně závisí na délce amplifikovaných

úseků. Podle detekční techniky se amplikony ponechávají v ds formě (elektroforéza), nebo se chemicky denaturují na ss formu (hybridizace se záchytnými sondami) [Pavlík, 1999].



Obr. 22 Průběh PCR

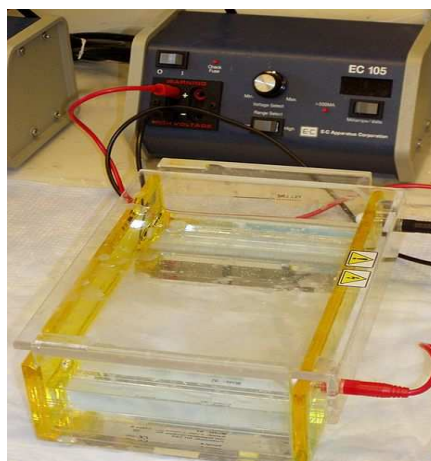
### 4.3 Reakční směs pro PCR

PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler. Ten je zkonstruován tak, aby bylo možné měnit automaticky a rychle teplotu potřebnou pro jednotlivé kroky reakce, a to i o několik desítek stupňů Celsia [Kočárek, 2004]. Vlastní reakce probíhá v tenkostěnných amplifikačních zkumavkách o objemu 200 nebo 500  $\mu$ l, podle typu cykleru. Většina moderních přístrojů má vyhřívané víko, aby nedocházelo ke kondenzaci kapalně reakční směsi na vnitřní straně víčka zkumavky. Reakční směs obsahuje primery, nukleotidy ve formě trifosfátů, vhodnou DNA polymerázu a pufr. V současnosti se již používá i patentem chráněný systém proti kontaminaci AmpErase<sup>TM</sup> (uracil-N-glykosyláza) [Pavlík, 1999].

#### 4.4 PCR-RFLP

Jde o techniku analyzující produkt PCR. RFLP (restriction fragment length polymorphism) – polymorfismus délky restrikčních fragmentů je technika, která umožňuje diferenciaci genomů, na základě spektra DNA fragmentů. Metoda je založená na sekvenční specifitě restrikčních endonukleáz. DNA nebo její fragmenty získané amplifikací se štěpí panelem restrikčních endonukleáz. Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které se specificky vážou na DNA a štěpí ji ve specifických místech nacházejících se uvnitř, nebo blízko rozpoznávací sekvence. Nově vzniklé fragmenty jsou děleny elektroforézou na agarosovém nebo akrylamidovém gelu. Výhodou je nenáročnost metody; mezi nevýhody patří nízká pravděpodobnost detekce mutací, která závisí i na počtu použitých enzymů [Hulák *et al.*, 2006]. Metoda RFLP má využití při zjišťování genetických rozdílů mezi několika jedinci jednoho druhu, např. k prenatálním testům na srpkovou anemii.

Po ukončení PCR se získá směs, obsahující velké množství zmnožených fragmentů, které je potřeba oddělit od zbytků DNA. Důležitou technikou na separaci (dělení) nukleových kyselin je elektroforéza. Je to fyzikálně-chemická metoda pro dělení látek v elektrickém poli. Zařízení se skládá z elektroforetické vany s anodou, katodou a pufrem, vlastního držáku gelu, ve kterém bude k separaci docházet, a externího zdroje stejnosměrného napětí [Knoll a Vykoukalová, 2002]. Termín „elektroforéza“ pochází z řečtiny a obecně znamená transport pomocí elektřiny. Je založená na izolaci molekul o rozdílné hmotnosti [Kočárek, 2004]. Sacharido-fosfátová páteř DNA je příčinou rovnoměrného rozložení záporných nábojů v molekule. Pohyb elektronegativních molekul v elektrickém poli ke kladné elektrodě vede k jejich separaci podle molekulové hmotnosti (agaróza tvoří v gelu síto o určité velikosti pórů, proto větší molekuly DNA putují pomaleji) [Vlášková a Trešlová, 2008]. Po skončení elektroforézy se fragmenty v gelu zviditelní přidáním fluorescenčního barviva, které se váže na DNA a v ultrafialovém světle jasně září [Kočárek, 2004].



Obr. 23 Aparatura na elektroforézu

## 4.5 Modifikace PCR

### 4.5.1 RT PCR

Protože řada virů má pouze RNA, nebylo možné jejich stanovení klasickou metodou PCR. Proto byla vyvinuta metoda RT PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) umožňující přímý důkaz infekčních agens za využití reverzní transkripce. Enzym reverzní traskriptáza, který umožňuje překopírování RNA do cDNA je termolabilní, nesnáší teplotu nad 42°C [Pavlík, 1999]. Tento problém byl odstraněn díky práci Meyerse a Gelfanda, kteří popsali v roce 1991 reverzní traskripční aktivitu, vázanou na přítomnost  $Mn^{2+}$  iontů u termostabilní DNA-polymerázy, kterou izolovali z bakterie *Thermus thermophilus*. Tento enzym je schopen reverzní transkripce i při teplotě 72°C [Meyers a Gelfand, 1991]. Díky tomuto objevu může RT PCR při vhodné konfiguraci testu, využívat jediný enzym rTth polymerázu [Pavlík, 1999]. Někteří autoři předpokládají, že účinnost reverní traskripce in vitro je nižší než 5% [Ferre, 1992]. Tato metoda bývá někdy chybně zaměňována za real time PCR (Q-PCR, qRT-PCR).

### 4.5.2 Multiplex PCR

Při této metodě se používá souprava více primerů v rámci jedné reakce PCR. Zaměřením více genů najednou lze z jednoho testu získat informace, pro jejichž získání by jinak bylo potřeba dalších činidel i času. Multiplex PCR je možné použít pro současnou amplifikaci více exonů jednoho genu. Tento způsob amplifikace se uplatňuje například při současné detekci interního kontrolního genu nebo při kvantitativní detekci [onkologickecentrum.cz].

### 4.5.3 Nested PCR

Ke zvýšení citlivosti a přesnosti stanovení bývá používána metoda nested PCR. Je založena na dvou po sobě následujících amplifikačních reakcích. Templátem první reakce je DNA izolovaná z testovaného vzorku, templátem druhé reakce je produkt reakce první. Reakce probíhá doufázově. Po skončení amplifikace se detekce produktu provádí gelovou elektroforézou. Výhodou této techniky je vysoká výtěžnost a specifita. Nested PCR ale vyžaduje podrobnější znalosti cílových sekvencí [Pavlík, 1999].

#### 4.5.4 Miniprimer PCR

Metoda miniprimer PCR využívá velmi malé primery – 9-10 nukleotidů. Tato metoda byla úspěšně použita pro detekci mikroorganismů v prostředí rybníka Puerto Rico. Miniprimer PCR umožňuje odhalit nové rozměry při stanovení mikrobu [Isenbarger, 2008].

#### 4.5.5 Real-time PCR

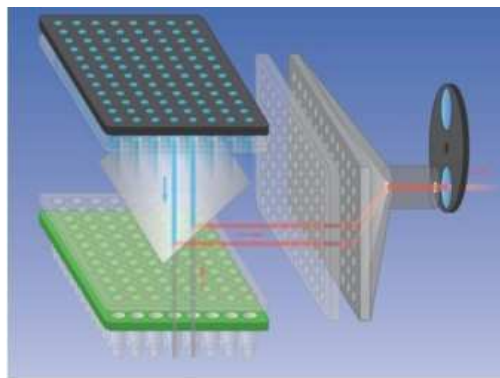
Kvantitativní PCR v reálném čase (Q-PCR/qRT-PCR; Real-time PCR) je metoda, která byla zavedena teprve před několika lety a využívá se jen krátkou dobu. Při této technice se kombinuje amplifikace DNA a detekce produktu v reálném čase [Eurogentec, 2004]. Při detekci metodou real-time PCR nedochází v cyklu pouze k cyklickému střídání teplot, ale je zde také v reálném čase monitorována fluorescence PCR produktu [Bílek, 2008]. Speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat přírůsteky DNA během každého cyklu (u klasického PCR se detekuje až finální produkt). Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Data jsou tedy sbírána během celého PCR procesu na speciálních "termocyklerech" s optikou umožňující excitaci substrátů a následnou detekci.

V průběhu počátečních cyklů PCR nedochází k signifikantnímu nárůstu fluorescence signálu resp. nedojde ke zvýšení množství PCR produktu [Tichopad *et al.*, 2003]. S narůstajícím počtem cyklů v PCR exponenciálně vzrůstá i množství PCR produktu tedy i fluorescenčního signálu, který je měřen [Bílek, 2008]. Optimálním bodem pro analýzu dat je exponenciální fáze reakce [de Kok *et al.*, 1998]. K detekci vznikajícího produktu mohou být použity různé systémy, které jsou založeny na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace [onkologickecentrum.cz].

Metoda real-time PCR je vysoce citlivá a přesná a právě proto je i velice náchylná k detekci různých nespecifických reakcí. Především při použití nespecifických barviv se vyskytují problémy s nespecifickým signálem [Wittwer *et al.*, 1997].

Teoreticky existuje kvantitativní vztah mezi množstvím výchozího vzorku a množstvím produktu PCR v daném cyklu. Real-Time PCR detekuje hromadění amplikonu během reakce. Údaje se pak měří v exponenciální fázi PCR. Tradiční metody PCR, které používají agarózového gelu nebo jiné detekční metody, nejsou příliš přesné. Real-Time PCR umožňuje kvantifikaci DNA a RNA jednodušeji a přesněji než starší metody [Applied biosystems, 2008].

Metoda real-time PCR má široké uplatnění v diagnostice nádorových onemocnění. Používá se při včasné detekci nádorových buněk, monitorování onemocnění v průběhu terapie a detekci minimální zbytkové choroby [Valášková, 2006]. Tato metoda je však v současnosti také využívána pro rychlou detekci mikroorganismů – např. pro detekci *Escherichia coli* je možné využít metodu rapid real-time PCR [Heijnen, 2009], pro stanovení *Citrobacter freundii* je vhodná metoda kinetická real-time PCR [Kaclíková, 2005]. Real-time PCR je možné dále využít pro detekci klostridií [Messelhaeusser, 2007], *Streptococcus pyogenes* [Dawson, 2009] a enterovirů [Rutjes, 2005].



obr. 24 Detekce fluorescence v real-time PCR přístroji

#### 4.6 PCR vs. real-time PCR

Hlavní výhodou metody real-time PCR oproti "klasickému" PCR je možnost kvantifikace syntetizovaného produktu, a to buď relativní, tj. porovnáním s jinou skupinou vzorků, nebo absolutní, z kalibrační křivky rekombinantní DNA o známém množství. Při hodnocení platí skutečnost, že čím vyšší je obsah nukleové kyseliny v testovaném vzorku (např. mRNA jako výraz úrovně exprese daného genu), tím rychlejší je přírůstek fluorescence. Z dalších výhod je nutno zmínit vysokou specifitu (zejména při použití sond) a citlivost (uvádí se, že zachytí geny 1 nádorové buňky na cca 100 000 zdravých buněk). V režimu fast umožňují přístroje ukončit analýzu do 35 minut místo původních 2,5 - 3 hodin.

Metodu real-time PCR je možno využít k detekcím jako PCR, ale hlavně se využívá k novým aplikacím, při kterých je tradiční PCR méně účinná. Díky sledování dat během reakce se metoda PCR rozšířila i do aplikací jako jsou: virová kvantifikace, kvantifikace genové exprese, měření poškození DNA, detekce patogenů, aj. [Applied biosystems, 2008].

## ZÁVĚR

Polymerázová řetězová reakce je metoda molekulární biologie pro enzymatickou replikaci DNA *in vitro*, bez použití živých organismů. Proces PCR reakce probíhá v termocykleru – přístroji, který dokáže přesně střídat jednotlivé teplotní kroky reakce.

Hlavní výhodou PCR je její vysoká citlivost. Ze dvou vláken nukleové kyseliny dokáže vytvořit po třiceti cyklech 1.073.741.824 molekul produktu. Díky tomu stačí pro tuto metodu jen velmi malé množství DNA. Primery, potřebné pro průběh PCR je možné navrhnout tak, že fungují např. jen při výskytu daných patogenů ve vzorku. To lze využít pro detekci patogenů v krvi pacientů, ale samozřejmě také z vody či jiných vzorků. PCR je vhodná ke stanovení virů, mykobakterií i jiných mikroorganismů, u kterých je kultivace příliš náročná a zdlouhavá.

Nevýhodou PCR je použití Taq DNA polymerázy, která se úspěšně používá v PCR pro svou odolnost při vysokých teplotách. Ale při použití klasické Taq-polymerázy má PCR určitá omezení, protože Taq polymeráza nemá tzv. korektorskou aktivitu, proto při syntéze nového vlákna dělá chyby, které není schopna opravit.

Při stanovení patogenů ve vodě, klinických i jiných vzorcích je výhodou PCR její rychlost a přesnost proti klasické kultivační metodě.



**SEZNAM LITERATURY**

- ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing, 2008. ISBN 978-0-8153-4106-2.
- AL-QADIRI, H. M., AL-HOLY, M.A., LIN, M. *Rapid detection and identification of Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli as pure and mixed cultures in bottled drinking water using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis*. Journal of agricultural and food chemistry, 2006, vol. 54, is. 16, p. 5749-5754. ISSN 0021-8561.
- ANTONIO, M., HAKEEM, I., SANKAREH, K. et al. *Evaluation of sequential multiplex PCR for direct detection of multiple serotypes of Streptococcus pneumoniae from nasopharyngeal secretions*. Journal of medical microbiology, 2009, vol. 58, is. 3, p. 296-302. ISSN: 0022-2615.
- Applied biosystems: Real-time PCR vs. Traditional PCR, 2006. 117GU11-01
- BALODA, S. B., KROVACEK, K., ERIKSSON, L. et al. *Detection of aerolysin gene in Aeromonas strains isolated from drinking-water, fish and foods by the polymerase chain-reaction*. Comparative immunology microbiology and infectious diseases, 1995 vol.18, is. 1 p. 17-&. ISSN: 0147-9571.
- BARBIERI, M.: *Organické kódy*, Praha: Academia 2006, ISBN 80-200-1403-9.
- BÍLEK, K. *Analýza diferenciálně exprimovaných genů a validace referenčních genů u prasat*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2008.
- CLARK, J., PAGEL, J. *Pollution indicator bacteria associated with municipal raw and drinking-water supplies*. Canadian journal of microbiology, 1977, vol. 23, is. 4, p. 465-475. ISSN: 0008-4166.
- COOPER, I. R., MEIKLE, S. T., STANDEN, G. et al. *The rapid and specific real-time detection of Legionella pneumophila in water samples using Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy*. Journal of microbiological methods, 2009, vol. 78, is. 1, p. 40-44. ISSN: 0167-7012.

- DAWSON, E.D., TAYLOR, A.W., SMAGALA, J.A., et al. *Molecular Detection of Streptococcus pyogenes and Streptococcus dysgalactiae subsp equisimilis*. Molecular biotechnology, 2009, vol. 42, is. 1, p. 117-127. ISSN: 1073-6085
- de KOK, J.B., HENDRIKS, J.C.M., van SOLINGE, W.W., et al. *Use of real-time quantitative PCR to compare DNA isolation methods*. Clinical chemistry, 1998, vol. 44, is. 10, p. 2201-2204. ISSN: 0009-9147
- Eurogentec, EGT group: Troubleshooting guide for qPCR and RT qPCR kits. 2004
- FERRE, F. *Quantitative or semiquantitative PCR: reality versus myth*. PCR methods applications 2, 1992, p. 1-9.
- FRAHM, E, OBST, U. *Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of Enterococcus spp. and Escherichia coli in water samples*. Journal of microbiological methods, 2003, vol. 52, is. 1, p. 123-131. ISSN: 0167-7012
- HARTL, D.L., JONES, E.W. *Genetics: Principles and analysis*. Toronto: Jones and Bartlett Publishers, 1998. ISBN 0-7637-0489-X.
- HEIJNEN, L., MEDEMA, G. *Method for rapid detection of viable Escherichia coli in water using real-time NASBA*. Water research, 2009, vol. 43, is. 12, p.3124-3132. ISSN: 0043-1354.
- HULÁK,M., FLAJŠHANS,M., LINHART,O. et al. *Využití molekulárních metod a DNA markerů v genetice ryb*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2006.
- *Hygienické požadavky na pitnou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody*. Sbírka zákonů Česká republika č. 252/2004. 22. dubna 2004.
- *Hygienický význam životních dějů ve vodách*. Praha: Avicenum, 1979. 588 s.
- ISENBARGER, T.A., FINNEY, M., RIOS-VELAZQUEZ, C. et al. *Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world*. Applied and environmental microbiology, 2008, vol. 74, is. 3, p. 840-849. ISSN: 0099-2240.

- *ISI Web of knowledge* [online]. Thomson Reuters 2010. Dostupné z <[www.apps.isiknowledge.com](http://www.apps.isiknowledge.com)>
- JIRASEK J., UHER J, UHROVA M, *Water and nitrogen content of body of young human embryos*. American journal of obstetrics and gynecology, 1966, vol. 96, is. 6, p. 868-&. ISSN: 0002-9378.
- KACLIKOVA, E., KRASCSENICSOVA, K., PANGALLO, D. et al. *Detection and quantification of Citrobacter freundii and C. braakii by 5'-nuclease polymerase chain reaction*. Current microbiology, 2005, vol. 51, is. 4, p. 229-232. ISSN: 0343-8651.
- KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z. *Molekulární genetika zvířat (Metody detekce polymorfismů DNA genů)*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická universita, 2002, ISBN 80-7157-616-6.
- KOČÁREK, E. *Vybrané aspekty lékařské genetiky*. Ústav dědičných metabolických poruch, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, 2008.
- KOČÁREK, E. *Genetika*, Praha: Scientia, 2004, ISBN80-7183-326-6.
- KOSITANONT, U., RUGSASUK, S., LEELAPORN, A. et al. *Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic Leptospira spp. by multiplex polymerase chain reaction*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2007, vol. 57, is. 2, p. 17-122. ISSN: 0732-8893.
- KULIČKA, M. *Co způsobuje mutace potřebné k evoluci?*, VTM Mladá fronta, 2008.
- KUMAR S.,BALAKRISHNA K., BATRA H. *Enrichment-ELISA for detection of Salmonella typhi from food and water samples*. Biomedical and environmental science, 2008, vol. 21, is. 2, p. 137-143. ISSN: 0895-3988.
- LIN, M., AL-HOLY, M., AL-QADIRI, H. et al. *Detection and discrimination of Enterobacter sakazakii (Cronobacter ssp.) by mid-infrared spektroskopy and multivariate statistical analyse*. Journal of food safety, 2009, vol. 29, is. 4, p. 531-545. ISSN: 0149-6085.

- MENA, K.D., GERBA, C.P. *Risk Assessment of Pseudomonas aeruginosa in Water*. Reviews of environmental contamination and toxicology, 2009, vol. 201, p. 71-115. ISSN: 0179-5953.
- MESSELHAUSSER, U., ZUCKER, R., ELMER-ENGLHARD, D. et al. *Detection and characterization of Clostridium perfringens by means of real-time-PCR*. Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit-journal of consumer protection and food safety, 2007, vol. 2, is. 2, p. 194-197. ISSN: 1661-5751.
- *Molekulárně biologické metody*. Onkologické centrum J. G. Mendela. Laboratoř molekulární biologie [online]. Medivis Pro 2000 – 2010. Dostupné z: <[www.onkologickecentrum.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf](http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf)>.
- MYERS, T.W., GELFAND, D.H. *Reverse transcription and DNA amplification by Thermus thermophilus DNA-polymerase*. Biochemistry, 1991, vol. 30, is. 31, p. 7661-7666. ISSN: 0006-2960.
- PANNEERSEELAN, L., MURIANA, P.M. *An Immunomagnetic PCR Signal Amplification Assay for Sensitive Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxins in Foods*. Journal of food protection, 2009, vol. 72, is. 12, p. 2538-2546. ISSN: 0362-028X.
- PAVLÍK, E. *Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku*. Praha: UK, 1. LF, Ústav pro lékařskou mikrobiologii, 1999.
- RABINOW, P. *Making PCR. A story of biotechnology*. Chicago and London: The university of Chicago press, 1996.
- ROSYPAL S. *Úvod do molekulární biologie I*. Brno 1998. ISBN 80-902562-0-1.
- RUTJES, S.A., ITALIAANDER, R., van den BERG H.H.J.L. et al. *Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification*. Applied and environmental microbiology, 2005, vol. 71, is. 7, p. 3734-3740. ISSN: 0099-2240.

- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F. et al. *Enzymatic Amplification of Beta-globin Genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1986, vol. 230, is. 4732, p. 1350-1354. ISSN: 0036-8075.
- SRŠEŇ, Š., SRŠŇOVÁ, K. *Základy klinické genetiky a její molekulární podstata*. Martin: Osveta 2005, ISBN: 978-80-8063-185-7.
- STURTEVANT, A.H. *Morgan Thomas Hunt*. American naturalist, 1946, vol. 80, is. 786, p. 22-23. ISSN: 0003-0147.
- ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
- THERON, J., CILLIERS, J., DU PREEZ, M. et al. *Detection of toxigenic Vibrio cholerae from environmental water samples by an enrichment broth cultivation-pit-stop semi-nested PCR procedure*. Journal of applied microbiology, 2000, vol. 89, is. 3, p. 539-546. ISSN: 1364-5072.
- THERON, J., MORAR, D., DU PREEZ, M. et al. *A sensitive seminested PCR method for the detection of Shigella in spiked environmental water samples*. Water research, 2001, vol. 35, is. 4, p. 869-874. ISSN: 0043-1354.
- TICHOPAD, A., DILGER, M., SCHWARZ, G. et al. *Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up*. Nucleic Acids Research, 2003, vol. 31. is. 20, art.n. e122. ISSN: 0305-1048.
- VALÁŠKOVÁ, I. *Laboratoř molekulární diagnostiky OLG*, Brno: Nemocniční listy FN, 2006, roč VII, č. 4.
- VLÁŠKOVÁ, H., TREŠLOVÁ, H. *Elektroforéza v agarózovém gelu (horizontální)* In: *Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice*. Praha: Všeobecná fakultní nemocnice, 2008. s. 21 – 23.
- VOTAVA, M.a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*, Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- WATSON, J. D. *Molekulární biologie genu*, Praha: Academia 1982.
- WATSON, J.D., CRICK, F. *Molecular structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature, 1953, vol. 171, is. 4356, p. 737-738. ISSN: 0028-0836.

- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K. et al. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. New York: CRC Press, 1995.
- WELLINGHAUSEN, N., SIEGEL, D., WINTER, J. et al. *Rapid diagnosis of candidaemia by real-time PCR detection of Candida DNA in blood samples*. *Journal of medical microbiology*, 2009, vol. 58, is. 8, p. 1106-1111. ISSN: 0022-2615.
- WILKINSON, H.W., DRASAR, V., THACKER, W.L. et al. *Legionella moravica sp-nov and Legionella brunensis sp-nov isolated from cooling-tower water*. *Annales de l institut Pasteur-microbiology*, 1988, vol. 139, is. 4, p. 393-402. ISSN: 0300-5410.
- WITTWER, C.T., RIRIE, K.M., ANDREW, R.V. et al. *The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control*. *Biotechniques*, 1997, vol. 22, is. 1, p. 176-181. ISSN: 0736-6205.
- ZÁVODSKÁ, R. *Biologie buněk*. Praha: Scientia 2006, ISBN 80-86960-15-3.

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

- obr. 1 [www2.m-techmicro.com/.../pseudomonas.jpg](http://www2.m-techmicro.com/.../pseudomonas.jpg)
- obr. 2 <http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/rep/esco.htm>
- obr. 3 [www.sci.muni.cz/mikrob/.../cfreund2p.jpg](http://www.sci.muni.cz/mikrob/.../cfreund2p.jpg)
- obr. 4 [www.rapidmicrobiology.com.../603h93p.JPG](http://www.rapidmicrobiology.com.../603h93p.JPG)
- obr. 5 [www.academic.pgcc.edu/~krober.../efaecal.gif](http://www.academic.pgcc.edu/~krober.../efaecal.gif)
- obr. 6 [www.genome.cbs.dtu.dk/s.../Clostridium02.gif](http://www.genome.cbs.dtu.dk/s.../Clostridium02.gif)
- obr. 7 [www.lf2.cuni.cz/Projekty/.../salmo20.jpg](http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/.../salmo20.jpg)
- obr. 8 [www.sci.muni.cz/mikrob/M.../shflex1p.jpg](http://www.sci.muni.cz/mikrob/M.../shflex1p.jpg)
- obr. 9 [www.sportsspecial.../vibrio\\_cholerae.jpg](http://www.sportsspecial.../vibrio_cholerae.jpg)
- obr. 10 [www.labecca.be/images/legionella.jpg](http://www.labecca.be/images/legionella.jpg)
- obr. 11 [www.difossombrone.it/zoolo.../staphylococcus\\_aureus.jpg](http://www.difossombrone.it/zoolo.../staphylococcus_aureus.jpg)
- obr. 12 [www.euroastra.info/files/ima.../strepto1.jpg](http://www.euroastra.info/files/ima.../strepto1.jpg)
- obr. 13 [www.buddycom.com/.../aeromonas1255th.jpg](http://www.buddycom.com/.../aeromonas1255th.jpg)
- obr. 14 [www.intestinalflora.org/ht.../candida\\_albicans02.jpg](http://www.intestinalflora.org/ht.../candida_albicans02.jpg)
- obr. 15 [www.koinuno-heya.com/b.../leptospira.jpg](http://www.koinuno-heya.com/b.../leptospira.jpg)
- obr. 16 [www.sci.muni.cz/mikrob/mik.../bunka2.png](http://www.sci.muni.cz/mikrob/mik.../bunka2.png)
- obr. 17 <http://images1.clinicaltools.com/images/gene/rna2.jpg>
- obr. 18 Hartl, D.L., Jones, E.W. : Genetics: Principles and analysis, Jones and Bartlett Publishers Toronto, 1998. p. 175, ISBN 0-7637-0489-X
- obr. 19 [www.genome.gov](http://www.genome.gov)
- obr. 20 <http://commons.wikimedia.org>
- obr. 21 [www.theadvocates.org/celebrities/kary-mullis.html](http://www.theadvocates.org/celebrities/kary-mullis.html)
- obr. 22 [www.wikipedie.cz](http://www.wikipedie.cz)
- obr. 23 [www.onkologickecentrum.cz](http://www.onkologickecentrum.cz)
- obr. 24 <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>