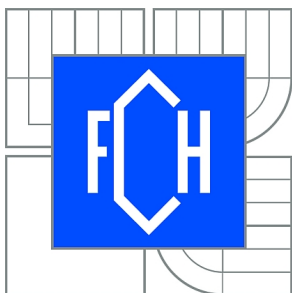




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ZHODNOCENÍ MÍRY KONTAMINACE RYB NETUBERKULÓZNÍMI MYKOBAKTERIEMI

EVALUATION OF THE LEVEL OF CONTAMINATION IN FISH BY NON-TUBERCULOUS
MYCOBACTERIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JIŘINA TRÁVNÍČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Michal Slaný, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0611/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jiřina Trávníčková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	RNDr. Michal Slaný, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Zhodnocení míry kontaminace ryb netuberkulózními mykobakteriemi

Zadání diplomové práce:

1. Teoretický úvod do problematiky
2. Popis metod použitých v rámci studie
3. Shrnutí dosažených výsledků
4. Diskuze výsledků s ohledem na současné znalosti a trendy

Termín odevzdání diplomové práce: 18.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jiřina Trávníčková
Student(ka)

RNDr. Michal Slaný, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem předložené diplomové práce bylo zhodnotit kontaminaci sladkovodních ryb netuberkulózními mykobakteriemi (NTM). Pomocí metod molekulární biologie byl u ryb pocházejících z povrchových vod České republiky sledován výskyt a distribuce NTM v různých tkáních (žábry, pažerákové zuby, svalovina, střevo aj.). NTM jsou častým patogenem v akvakulturách sloužících k chovu pro komerční účely. S ohledem na tuto skutečnost byl sledován výskyt NTM v mase ryb (amur bílý, kapr obecný, lín obecný, candát obecný, tilapie nilská apod.) pocházejících z tržní sítě, neboť zpracování a případná konzumace nedostatečně tepelně opracovaného masa kontaminovaného NTM může v některých případech představovat zdravotní riziko pro člověka.

Teoretická část se zabývá obecným popisem mykobakterií, jejich klinickým významem a působností z hlediska bezpečnosti potravin. Je zde také shrnuta problematika detekce a identifikace jednotlivých mykobakteriálních druhů. Praktická část je věnována popisu jednotlivých pracovních postupů a vyhodnocení veškerých naměřených výsledků. Během práce byly připraveny pozitivní kontroly PCR reakce ve formě plazmidové DNA, byla stanovena analytická citlivost PCR reakce, účinnost izolace mykobakteriální DNA z masa a byla posouzena míra kontaminace NTM u vyšetřených ryb.

ABSTRACT

The aim of a presented diploma thesis was to evaluate the level of contamination in fish by nontuberculous mycobacteria (NTM). Methods of molecular biology were used to monitor the incidence and distribution of NTM in tissues of freshwater fish (gills, pharyngeal teeth, muscles, intestine etc.). NTM frequently occur in aquacultures for commercial use. With this in mind the occurrence of NTM was monitored in fish meat (*Ctenopharyngodon idella*, *Cyprinus carpio*, *Tinca tinca*, *Sander lucioperca*, *Oreochromis niloticus* etc.) from the market, because processing and consumption of insufficiently heat treated meat contaminated with NTM may pose health risk to humans.

The theoretical part deals with the description of mycobacteria, their clinical significance and responsibilities in food safety. There are summarised methods for detection and identification of individual mycobacterial species. The experimental part is devoted to the description of used methods followed by evaluation of experimentally obtained data. The plasmid DNA was prepared as positive controls for PCR reaction. Furthermore, the analytical sensitivity of PCR reaction and efficiency of isolation of mycobacterial DNA isolation from fish meat were determined. Lastly, the level of NTM contamination in fish was evaluated.

KLÍČOVÁ SLOVA

molekulární mikrobiologie, ekologie mykobakterií, bezpečnost potravin

KEYWORDS

molecular microbiology, ecology of mycobacteria, food safety

TRÁVNÍČKOVÁ, J. Zhodnocení míry kontaminace ryb netuberkulózními mykobakteriemi. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 60 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Michal Slaný, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně odcitovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat především RNDr. Michalu Slanému, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení a cenné rady během měření a psaní diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu pracovníků Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně za ochotu poradit a rodině a přátelům za podporu během celého studia.

OBSAH

Obsah	5
1 Úvod.....	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 Charakteristika rodu <i>Mycobacterium</i>	8
2.1.1 Obecná charakteristika mykobakterií	8
2.1.2 Charakteristika buněčné stěny	8
2.1.3 Rozdělení mykobakterií.....	9
2.2 Klinický význam mykobakterií	10
2.2.1 Tuberkulóza a malomocenství.....	10
2.2.2 Paratuberkulóza – Johného choroba	11
2.2.3 Plicní infekce způsobené NTM	12
2.2.4 Kožní infekce způsobené NTM.....	13
2.2.5 Lymfadenitida.....	16
2.2.6 Systémová mykobakteriální onemocnění.....	16
2.3 Metody pro detekci mykobakterií	17
2.3.1 Mikrobiologické metody	17
2.3.2 Molekulárně diagnostické metody.....	19
2.4 Bezpečnost potravin.....	23
3 Experimentální část.....	25
3.1 Přístroje a pomůcky	25
3.2 Chemikálie	26
3.3 Vyšetřované vzorky	27
3.4 Pracovní postupy.....	27
3.4.1 Izolace bakteriální DNA z živočišné tkáně	27
3.4.2 MTC duplex PCR	28
3.4.3 Klonování – příprava standardů pro MTC duplex PCR	30
3.4.4 Sekvenování.....	32
3.4.5 <i>erp</i> qPCR	33
4 Výsledky a diskuze	35
4.1 Příprava standardů a stanovení limitu detekce MTC duplex PCR	35

4.2	Stanovení účinnosti izolace mykobakteriální DNA <i>M. marinum</i> z živočišných tkání.....	37
4.3	Sledování výskytu a distribuce mykobakterií v orgánech sladkovodních ryb z našich povrchových vod.....	38
4.4	Sledování výskytu mykobakterií v rybím mase pocházejícím z tržní sítě.....	43
5	Závěr.....	49
6	Reference.....	51
7	Seznam tabulek, obrázků a grafů.....	58
7.1	Tabulky.....	58
7.2	Obrázky.....	58
7.3	Grafy.....	58
8	Seznam zkratk.....	59

1 ÚVOD

Infekční onemocnění jako taková provázejí lidstvo už od jeho počátků. Infekce jsou obecně způsobovány mikroorganismy, které napadají hostitelský organismus a narušují jeho vnitřní prostředí tak, aby se mohly rozmnožovat a vyvíjet. V případě, že hostitelem je jedinec s nenarušenou funkcí imunitního systému, má schopnost s infekčním činitelem bojovat (např. zvýšenou teplotou těla) a zlikvidovat jej. V dřívějších dobách byly nebezpečné nemoci, které se nám dnes jeví jako banální a umíme je běžně léčit. Lékařská věda však v průběhu staletí zaznamenala pokrok ve vývoji účinných léčiv, které pomáhají tělu s těmito mikroorganismy bojovat.

Zástupci rodu *Mycobacterium* jsou jednak původci klasické tuberkulózy (např. *M. tuberculosis*), ale také mohou způsobovat méně časté infekce člověka a zvířat obecně nazývané mykobakterií. Samotná infekce byla často spojena s určitou indispozicí nemocného jedince; v minulosti můžeme hovořit např. o nedostatku jídla a s ním spojeným nedostatkem vitamínů, oslabení organismu jako celku, nedodržování hygienických návyků apod. [1][2]

Vůbec jedním z nejznámějších a nejobávanějších mykobakteriálních onemocnění, se kterým se lidstvo potýká již od pravěku, byla tuberkulóza, dříve také nazývána úbytě nebo souchotiny. Tuberkulóza je způsobena bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Ve vyspělých státech byla účinně potlačena očkováním, v zemích třetího světa však představuje stále přetrvávající problém i ve 21. století [3]. Další obávanou infekcí způsobenou činitelem *M. leprae* se stalo malomocenství neboli lepra. První písemné záznamy o malomocenství byly zaznamenány již roku 1 500 př. n. l., velkou hrozbou se však stala během křížových válek, kdy se křesťanští vojáci vraceli z křížových výprav z Asie, kde se touto nemocí nakazili, a rozšířili ji do Evropy. Tyto dvě mykobakterie naprosto zastínily význam ostatních, tzv. netuberkulózních mykobakterií [3][4].

Mykobakteriální infekce způsobené netuberkulózními mykobakteriemi (NTM) upoutaly pozornost v 80. letech 20. století, kdy můžeme hovořit o počátku epidemie *HIV/AIDS* [1][5]. Toto onemocnění s sebou nese silné potlačení funkce imunitního systému nemocného jedince, který se tak stává náchylnějším ke vzácně se vyskytujícím infekcím. Právě potlačení funkce imunity je signálem pro útok mykobakterií a propuknutí onemocnění, které je často obtížně léčitelné běžnou antimikrobiální léčbou [1][6].

V posledních letech se pozornost vědců a lékařů zaměřila také na bezpečnost a mikrobiologickou nezávadnost potravin. Mykobakterie vyskytující se běžně v životním prostředí mohou představovat riziko vedoucí ke kontaminaci některých potravin (např. ryby, mléko nebo mléčné výrobky). V poslední době dochází k nárůstu případů mykobakterií, a proto je důležité určit možné zdroje NTM a tím minimalizovat možnosti kontaminace člověka s následným vznikem infekce [7][8].

Diplomová práce je proto zaměřena na posouzení kontaminace rybího masa NTM. Vzorky ryb pocházely z tuzemské tržní sítě a ze sladkých povrchových vod. U vzorků byla provedena detekce a identifikace mykobakterií pomocí mikroskopických a molekulárně biologických metod a na základě získaných výsledků byla posouzena mikrobiologická nezávadnost ryb vyskytujících se na tuzemském trhu.

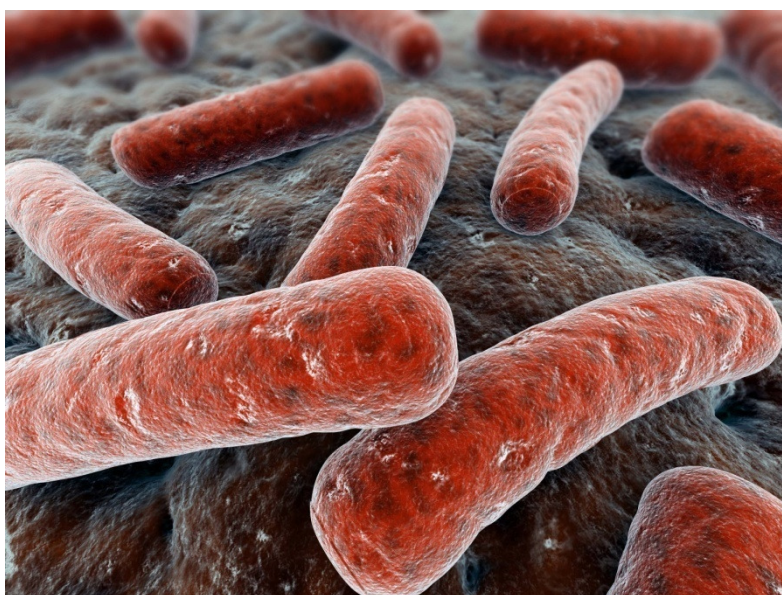
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika rodu *Mycobacterium*

2.1.1 Obecná charakteristika mykobakterií

Mykobakterie jsou aerobní, acidorezistentní, nepohyblivé, nesporulující rovné nebo mírně zakřivené tyčky (**Obrázek 1**). Mohou tvořit vlákna nebo mycelium připomínající struktury, které se ale snadno rozpadají zpět do tyček. Obtížně se barví Gramovou metodou, obvykle jsou slabě grampozitivní [9][10]. Jedním z charakteristických a v bakteriální říši ojedinělých znaků je acidorezistence barvení, tj. buňky obarvené kalbofuchsinem se neodbarví působením okyseleného etanolu nebo působením samotných kyselin [11], čehož se využívá při mikroskopickém stanovení mykobakterií ve vzorku.

Jedná se o početnou skupinu bakterií. V současné době je známo na 155 mykobakteriálních druhů a 15 poddruhů [12].



Obrázek 1 – *Mycobacterium tuberculosis* [10].

2.1.2 Charakteristika buněčné stěny

Vnější membrána mykobakterií obsahuje esterifikovanou kyselinu mykolovou o velmi dlouhých větvených řetězcích, což přispívá k hydrofobicitě, nepropustnosti a pomalému růstu pomalu i rychle rostoucích mykobakterií [13]. Tento znak má za následek přilnavost k povrchům, tvorbu biofilmů, rezistenci k desinfekčním činidlům a antibiotikům [5]. Jsou odolné vůči vysušení, proto mohou přežívat a zůstat infekční v prostředí po dlouhou dobu [14].

2.1.3 Rozdělení mykobakterií

Mykobakterie jsou nejčastěji děleny do dvou kategorií – pravé (tuberkulózní) mykobakterie obligátně patogenní pro člověka a mykobakterie netuberkulózní, které mohou vyvolat onemocnění za určitých podmínek (viz kapitola 2.2.3 Plicní infekce způsobené NTM). Pro potřeby diplomové práce je třeba uvést také dělení podle rychlosti růstu a tvorby pigmentů.

tuberkulózní mykobakterie

Nejlépe prostudovanou a popsanou skupinou jsou obligátně patogenní mykobakterie patřící do komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), jehož zástupci jsou původci závažných infekcí u člověka. Do tohoto komplexu patří *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG¹ a tři méně často se vyskytující *M. microti*, *M. canettii* a *M. pinnipedii* [15].

netuberkulózní mykobakterie

Netuberkulózní mykobakterie (NTM) jsou organismy běžně se nacházející v prostředí. Byly izolovány z vodních systémů, ale také z půdy, prachu a rostlin [6]. Jsou řazeny mezi podmíněně patogenní bakterie, které mohou způsobit infekce lidí a zvířat. V historii byly zastíněny *M. tuberculosis* způsobující tuberkulózu u lidí; jejich klinický význam byl objasněn teprve nedávno [6].

Mezi zástupce nejběžněji izolovaných NTM z lidí jsou *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. abscessus*, *M. chelonae* [5].

dělení dle rychlosti růstu

Dalším možným dělením mykobakterií je dělení dle rychlosti růstu na rychle rostoucí a pomalu rostoucí mykobakterie.

- Rychle rostoucí mykobakterie tvoří kolonie při kultivaci během 3 – 7 dní. Jako zástupci rychle rostoucích mykobakterií jsou uváděny *M. abscessus*, *M. chelonae* nebo *M. fortuitum*.
- Pomalu rostoucí mykobakterie potřebují pro růst kultury delší čas, obecně je uváděno více jak sedm dní, kultivace však trvá až několik měsíců. Mezi pomalu rostoucí mykobakterie patří např. *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum* aj. [5]

¹ Bacil Calmettův-Guérinův – oslabený tuberkulózní bacil bovinního typu užívaný od roku 1921 k přípravě očkovací látky pro aktivní imunizaci proti TBC.

dělení dle produkce pigmentů

Pomalou rostoucí NTM jsou děleny do tří kategorií podle produkce pigmentů (klasifikace dle Runyona) [1]:

- I. **fotochromogenní** – mykobakterie tvoří kolonie produkující žluto-oranžový pigment v přítomnosti světla, v temnu jsou kolonie bezbarvé (*M. kansasii*, *M. marinum*)
- II. **skotochromogenní** – mykobakterie tvoří kolonie produkující žluto-oranžový pigment při růstu na světle nebo ve tmě (*M. goodii*, *M. scrofulaceum*)
- III. **nechromogenní** – mykobakterie tvoří bezbarvé kolonie (*M. ulcerans*)

Za čtvrtou skupinu lze považovat rychle rostoucí mykobakterie, které netvoří pigmenty vůbec [1].

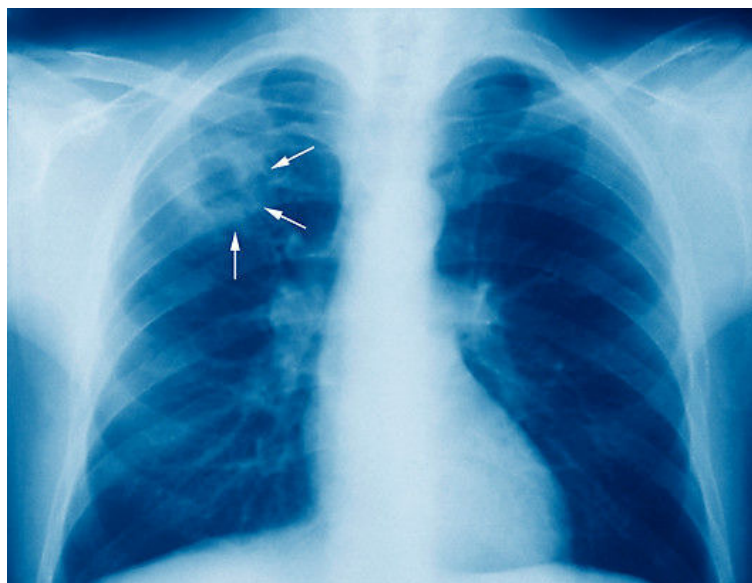
2.2 Klinický význam mykobakterií

2.2.1 Tuberkulóza a malomocenství

Mykobakteriální onemocnění provázejí lidstvo již od nepaměti. Nejznámější mykobakteriální infekcí je tuberkulóza (TBC) způsobená *M. tuberculosis*, které je v rozvojových zemích stále jedním ze závažných bakteriálních patogenů. V důsledku této infekce dochází ročně k úmrtí kolem tří milionů lidí a dalších devět milionů je nakaženo následkem chudoby, podvýživy a špatných životních podmínek. Ve vyspělých zemích je riziko propuknutí TBC sníženo očkováním. *M. tuberculosis* napadá primárně plíce (**Obrázek 2**), infekce však může být rozšířena krevním a lymfatickým systémem také do jiných částí organismu [3][16][17].

Mezi další vážné mykobakteriální onemocnění patří malomocenství neboli lepra. Lepra je jedním z nejstarších mykobakteriálních infekcí známých už od antických dob, kdy bylo spojováno s morální nečistotou postiženého a bylo považováno za Boží trest. Nejstarší zmínka o lepre pochází z roku 1500 př. n. l. Jedná se o chronické infekční onemocnění způsobené bakterií *M. leprae*² napadající kůži, sliznice a nervy na periferních částech těla [4]. Přenos infekce je úzce spojen s přelidněním a nedostačující hygienou v chudých oblastech, tj. dlouhodobým přímým kontaktem s postiženým a tzv. kapénkovou infekcí (vdechováním kapének uvolněných během kýchání a kašlání nemocných) [3][4][18].

² *M. leprae* bylo objeveno norským vědcem G. A. Hansenem roku 1873 jako první bakteriální původce lidské infekce [3].



Obrázek 2 – RTG snímek plíce postižené TBC; postižená oblast je zvýrazněna šipkami [19].

2.2.2 Paratuberkulóza – Johneho choroba

Paratuberkulóza (nebo také Johneho choroba) je chronické infekční onemocnění zvířat, především skotu a dalších přežvýkavců. Původcem je *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*), které napadá zažívací trakt skotu a způsobuje závažné zdravotní problémy. Výzkumy však prokázaly, že *MAP* nemusí být lokalizována pouze ve střevech nemocného zvířete, ale mohou být infikovány také další orgány (např. mléčné žlázy a reprodukční orgány) [20].

MAP je jednou z nejpomaleji rostoucích mykobakterií (3 – 9 měsíců). Jedná se o obligátně patogenní bakterii, která je původcem paratuberkulózy u skotu a v posledních letech je stále více spojována také s Crohnovou chorobou u lidí [21].

přenos a příznaky

Nejvíce rizikovým faktorem pro rozšíření choroby je nemocný kus ve stádě. Zdrojem bakterií může také být trus nakažených zvířat, kontaminované krmivo, pastviny, voda a mléko. Poslední zmíněné je nebezpečné při přenosu infekce z matky (např. krávy) na mládě. [22]. *MAP* proniká do organismu mladého zvířete, kde však nemusí způsobovat příznaky onemocnění. Infikovaný kus se tak stává nebezpečným nosičem a může způsobit nákazu dalších zvířat. Důsledkem skryté infekce je snížení dojivosti samic a schopnosti reprodukce, což má za následek ekonomickou ztrátu chovatele [23].

Mezi klinické příznaky infekce patří zánět střev, který vede k urputným průjmům a ztrátě hmotnosti, což často vede k úhynu zvířete.

výskyt

Paratuberkulóza skotu je celosvětově se vyskytující onemocnění jak u chovů dobytka, tak u divoce žijících přežvýkavců. Onemocnění je evidováno v zemích Afriky, v Austrálii a na Novém Zélandu, hojně je rozšířeno v jižní a jihovýchodní části Asie, v Evropě a částečně ve Střední a Jižní Americe [22].

2.2.3 Plicní infekce způsobené NTM

Plíce mohou být snadno napadeny vdechováním aerosolů obsahujících značné množství mykobakterií [6], a proto jsou chronické plicní infekce způsobené NTM nejběžnějším projevem působení těchto mykobakterií na lidský organismus [1].

Mezi NTM způsobující nejčastěji plicní infekce patří zástupci komplexu *Mycobacterium avium*. (MAC) *M. avium hominissuis* a *M. avium avium*. Je pozoruhodné, že plicní mykobakteriální infekce mohou být zapříčiněny na různých kontinentech různými NTM – ve Spojených státech amerických se jedná především o *M. intracellulare* a *M. kansasii*, v Evropě převládá *M. xenopi* a *M. malmoense* [6].

přenos a příznaky

NTM jsou původci plicních mykobakteriálních onemocnění především:

- u lidí s oslabenou imunitou v důsledku *HIV/AIDS* infekce, rakoviny, chemoterapie či imunosupresivní léčby spojené s transplantací orgánů
- u lidí s již existujícím onemocněním plic nebo deformovanou hrudní stavbou
- u alkoholiků a kuřáků [5]

Průběh plicního onemocnění proto lze charakterizovat dvěma různými přístupy – pacienti *HIV* negativní a pacienti s *HIV/AIDS*.

V prvním případě jsou příznaky nerozlišitelné od tuberkulózy a je charakterizována velmi pomalým průběhem. Nejvíce ohroženou skupinou lidí jsou starší osoby (především muži) s predisponujícím plicním onemocněním (např. silikóza, cystická fibróza [1], chronická obstrukční choroba, pneumokonióza, již prodělaná tuberkulóza či rakovina plic). Typickými příznaky jsou kašel, horečka, ztráta hmotnosti, slabost a plicní nedostatečnost [6].

Druhou ohroženou skupinou jsou potom pacienti trpící *HIV/AIDS*. Průběh nemoci je zpravidla velmi rychlý a typickými příznaky jsou kašel, horečka a ztráta hmotnosti [6].

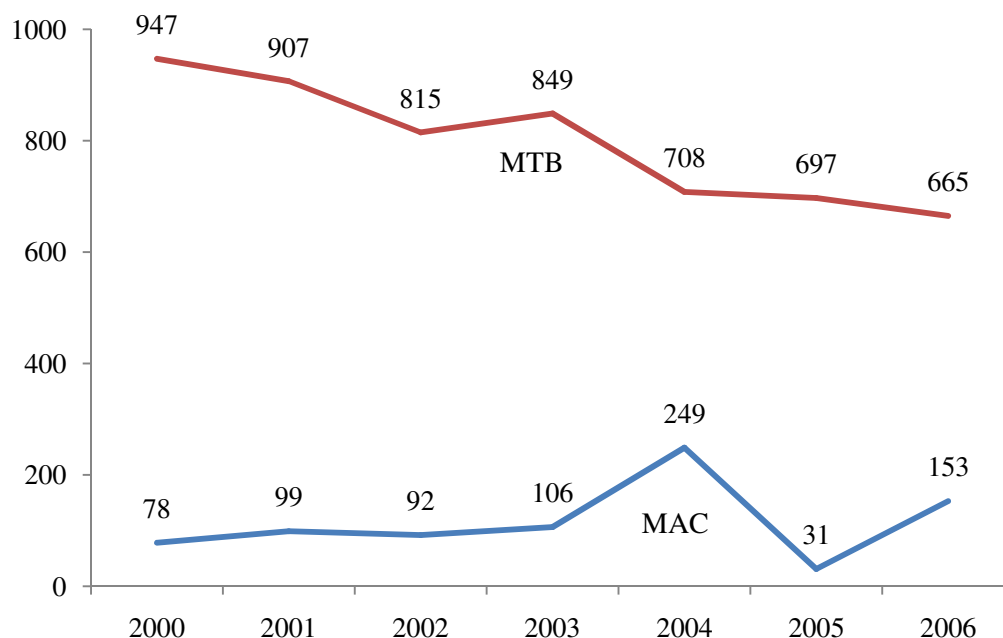
Přenos NTM z člověka na člověka zatím nebyl zaznamenán [6] a byl prakticky vyloučen [20]. Pacienti jsou často infikováni při kontaktu s kontaminovaným prostředím (půda, prach, voda). Jak už bylo zmíněno, nejvíce ohrožení jsou pacienti s poruchou funkce imunitního systému či s oslabením plic. Další rizikovou skupinou jsou lidé pracující v prašném prostředí, např. farmáři či horníci [22].

výskyt

S postupnou eliminací humánní tuberkulózy v rozvinutých zemích začala incidence plicních mykobakterií způsobených NTM narůstat. Tento trend je zapříčiněn také rozvojem molekulárně diagnostických metod (tj. přesnějším určením infekcí) [23]. Zvýšený výskyt byl zaznamenán především ve Spojených státech amerických a v Evropě (Skandinávie a Velká Británie) [6].

V České republice byl v minulosti taktéž zaznamenán nárůst mykobakteriálních plicních onemocnění způsobených zástupci *MAC* (**Graf 1**).

Graf 1 – Trend výskytu infekcí způsobených *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) a *MAC* u lidí v České republice [24].



2.2.4 Kožní infekce způsobené NTM

Kožní infekce způsobené netuberkulózními mykobakteriemi se nejčastěji projevují na měkkých tkáních rukou, loktů, na kolenech a chodidlech. Jsou charakteristické tvorbou granulomatózních uzlíků, z nichž se mohou vyvinout vředy. V těžších formách mohou být zasaženy také lymfatické uzliny, klouby, šlachy aj [6].

Mezi nejvýznamnější zástupce NTM způsobující kožní infekce u lidí patří *M. marinum* a *M. ulcerans*. Jedná se o pomalu rostoucí mykobakterie, které při kultivaci preferují chladnější teploty (30-33 °C) [3].

Mycobacterium marinum

M. marinum je široce rozšířeno ve vodním prostředí, především v pomalu tekoucí, případně stojaté sladké i mořské vodě. V 60. letech minulého století byly infekce spojené s *M. marinum* přisuzovány pouze špatné chloraci bazénové vody. V dnešní době je prokázána také spojitost mezi mykobakteriální infekcí způsobené *M. marinum* a akvaristikou nebo prací v rybářském průmyslu. Zmíněné zdroje nákazy daly vzniknout pojmenování infekce „swimming pool granuloma“ či „fish-tank granuloma“ [2].

přenos a příznaky

M. marinum způsobuje chronické onemocnění měkkých tkání jak u zdravých jedinců, tak u jedinců s oslabenou funkcí imunitního systému. Jak už sám název napovídá, během nemoci se na kůži tvoří drobné bezbolestné léze (granulomy). Prvními příznaky infekce jsou zarudnutí kůže a tvorba pupínků (podobné vyrážce). Pokud není infekce včas a správně léčena, léze mohou praskat a vytvářet jizvy. V dalších stádiích se infekce může projevit jako zánět šlachové pochvy, zánět kloubů nebo zánět kostní dřeně. Nejčastěji jsou napadány dlaně, lokty, kolena a paty [2][3].

Infekce je přenášena přímým stykem člověka s infikovaným prostředím. Mezi dva hlavní rizikové faktory pro přenos infekce způsobené *M. marinum* patří drobné oděrky na kůži a dlouhodobý styk s kontaminovanou vodou v přirozených vodních tocích, nádržích nebo akváriích a s organismy v nich žijících [22].



Obrázek 3 – Projevy kožní infekce způsobena *Mycobacteriu. marinum* [25].

výskyt

Onemocnění způsobené *M. marinum* je rozšířeno celosvětově. Nárůst pacientů postižených touto infekcí byl zaznamenán s rostoucí oblibou veřejných bazénů, kde docházelo k nesprávné chloraci vody, a akvaristiky. Infekce se často vyskytuje také v oblastech, kde jsou zdrojem obživy rybolov či chov ryb na rybích farmách [22].

infekce u ryb

M. marinum je příčinou infekčního onemocnění nejen u lidí, ale také u ryb. Rizikovým faktorem pro rozvoj infekce v akvariijní kultuře je přítomnost nemocného kusu, který může dále infikovat další ryby [22]. Způsobuje chronickou infekci, která je charakteristická tvorbou granulomů obsahujících mykobakterie především v játrech, ledvinách, slezině a střevě infikovaných ryb. Mimo tvorbu granulomů patří mezi příznaky onemocnění malátnost, ztráta apetitu a úbytek na váze, změny na kůži, poškození ploutví aj. [25] Mezi další mykobakteriální činitele, kteří způsobují infekci u ryb, patří *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* a *M. gordonae* [27].

Léčba mykobakterióz u ryb není patřičně vyvinutá, proto je nutné dbát především na prevenci v chovech, tj. pravidelné veterinární prohlídky a dostatečná hygiena při manipulaci s obsahem akvárií. Infikované rybí kultury se mohou stát potenciálním zdrojem nákazy pro chovatele [26].

Mycobacterium ulcerans

M. ulcerans způsobuje závažné kožní problémy u lidí s oslabeným imunitním systémem, tzv. vředy „buruli ulcer“. *M. ulcerans* se běžně vyskytuje v pomalu tekoucích řekách, vodních nádržích, močálech a jezerech. V historii byla většina případů zaznamenána podél toku řeky Nil a v Ugandě³ [22].

přenos a příznaky

Jedná se o závažné nekrotizující vředové onemocnění, vyskytující se převážně u dětí ve věku 4 – 15 let. Mezi první příznaky patří výskyt malých kožních uzlíků, ze kterých se infekce šíří do podkožní části kůže [22]. Uzlíky se poté zvětšují a tvoří praskající, relativně nebolestivé vředy, které se spontánně hojí [28]. Hojení je provázeno tvorbou velkých jizev, které mohou být omezující [6] – trvalá deformace končetin, slepota a jiné nepříznivé následky, což má také ekonomický a sociální dopad na postiženého člověka [28].

V minulosti bylo předpokládáno, že infekce je přenosná pravděpodobně pouze z člověka na člověka díky přítomnosti silně bakteriálních ložisek v okolí již prasklých vředů [6][22]. Současné studie však prokázaly, že člověk může být infikován také při styku s prostředím, kde se *M. ulcerans* nachází – kontaminovaná voda, půda nebo vegetace, jedním z potenciálních přenašečů jsou zástupci řádu polokřídlých (bodavý vodní hmyz), který je schopen přenášet *M. ulcerans* ve slinných žlázách [28][29]. Stejně jako u infekce způsobené *M. marinum* je i zde rizikovým faktorem poranění či podráždění kůže a dlouhodobější kontakt s kontaminovaným prostředím.

³ Uganda byla v historii nazývána Zemí Buruli, odkud byl odvozen název onemocnění [22].

výskyt

Infekce způsobená *M. ulcerans* se nejhojněji vyskytuje v západní a střední části Afriky, v subtropických a tropických oblastech Jižní i Severní Ameriky, ve východní a jihovýchodní části. V České republice nebyl zaznamenán dosud žádný případ. Byly však evidovány případy evropských cestovatelů s tímto postižením [30].

2.2.5 Lymfadenitida

Lymfadenitida, neboli zánět mízních uzlin, je nejčastějším projevem infekce způsobené NTM u dětí ve vyspělých zemích. V 70. letech 20. století byla nejvíce se vyskytujícím původcem infekce *M. scrofulaceum*, v současné době však hraje významnější roli MAC, který je potvrzován přibližně v 80 % kultivovaných vzorků [1][6].

přenos a příznaky

Nejvyšší riziko výskytu infekce mízních uzlin je patrné u dětí ve věku 1 – 5 let, u dospělých je onemocnění vzácné [32]. Dětský organismus je obvykle infikován orálně a to díky častému vnášení špinavých rukou a cizích předmětů do úst [6]. NTM nejčastěji napadají mízní uzliny v hlavě a krku, zejména přední krční uzliny, proto je hlavním příznakem bolestivé polykání [2].

diagnóza a léčba

Jak již bylo naznačeno v úvodu této kapitoly, infekce lymfatických uzlin je potvrzována buď pozitivními kultivacemi kultur NTM z infikovaných lymfatických uzlin, nebo histopatologické vyšetření kombinované s vyloučením *M. tuberculosis* infekce. Antimikrobiální léčba je obecně neefektivní, jedinou skutečně účinnou terapií je důkladné chirurgické odstranění postižených uzlin [1][2].

2.2.6 Systémová mykobakteriální onemocnění

V literatuře byly popsány ojedinělé případy systémového rozšíření NTM infekce do dalších orgánů infikovaného jedince [31]. Nejčastěji dojde k rozšíření infekce u pacientů s potlačenou funkcí imunitního systému v důsledku dalších systémových onemocnění (diabetes mellitus, CHOPN, *HIV/AIDS*) nebo probíhající léčebné terapie [1][31]. Nejčastějším původcem systémových infekcí jsou zástupci MAC [2]. V současné době je však dokázáno působení dalších mykobakterií, např. *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. marinum* aj. [1][6][13]

přenos a příznaky

Nejčastější branou vstupu infekce do organismu jsou dýchací cesty a zažívací trakt [6]. Hlavními příznaky systémového mykobakteriálního onemocnění jsou vysoké horečky, nevolnost, ztráta hmotnosti, bolesti břicha, nadměrné pocení, zadržávání řeči a jiné. Mohou se také vyskytovat podkožní uzlíky nebo abscesy [1][2].

Například infekce způsobená *M. intracellulare* může být v organismu vzácně prezentována jako tuberkulomy⁴, které imitují nádorový proces (tzv. pseudotumory). Byl zaznamenán výskyt mykobakteriálních pseudotumorů v mízních uzlinách, kostní dřeni, střevech, na kůži, v plicích a mozku [1].

diagnóza a léčba

Nejvíce užívanou metodou pro diagnózu systémového onemocnění způsobené NTM je kultivace vzorků kostní dřene nebo krve postižených pacientů. V případě, že projevem infekce jsou kožní léze, provádí se také kultivace stěrů nebo biopsie postižených oblastí této tkáně [1].

Léčba je zpravidla zdlouhavá a založena na souběžné aplikaci dvou a více antituberkulotik, neboť NTM jsou zpravidla rezistentní ke klasickým antibiotikům. Systémová infekce způsobená NTM není často diagnostikována s ohledem na nespecifické příznaky onemocnění, a také v důsledku dalšího systémového onemocnění pacienta, které je v popředí zájmu klinických lékařů [1][6].

2.3 Metody pro detekci mykobakterií

Se změnou životního stylu a stravovacích návyků dochází v poslední době k nárůstu infekcí způsobených NTM. S ohledem na tuto skutečnost byla vyvinuta snaha zavést rychlé a dostatečně citlivé metody vhodné pro detekci a identifikaci jednotlivých mykobakteriálních druhů. [33]. Správné určení mykobakterie přítomné ve vzorku je důležité především z hlediska jejího klinického významu a cílené antibiotické terapie [2].

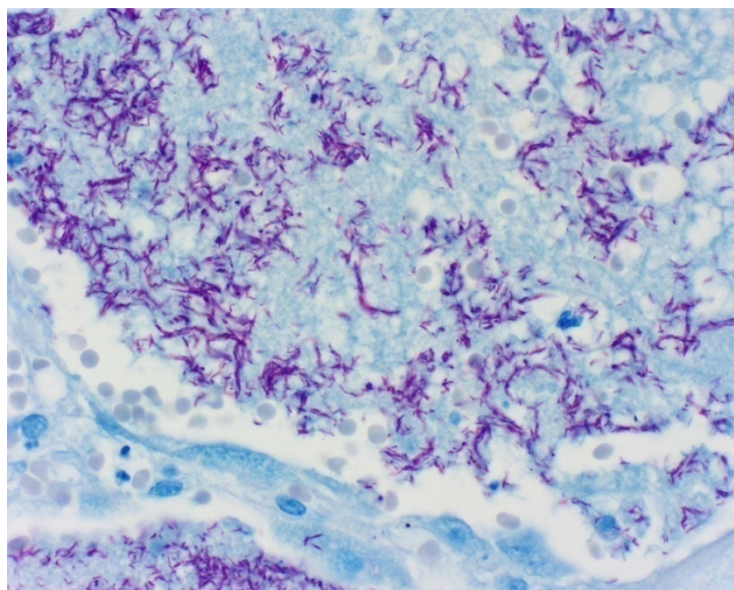
2.3.1 Mikrobiologické metody

Mikroskopie

Jak již bylo zmíněno v kapitole **2.1.1 Obecná charakteristika mykobakterií**, mykobakterie patří mezi acidorezistentní organismy. Této vlastnosti se využívá při mikroskopickém stanovení mykobakterií dle Ziehl-Neelsena. Buňky po obarvení karbolfuchsinem nejsou odbarvovány kyselým etanolem nebo minerálními kyselinami. Metoda je podstatně rychlejší, ale méně citlivá než metody kultivační, přesto hraje významnou roli při diagnóze mykobakteriálního onemocnění [11][34].

Další doporučenou metodou barvení před mikroskopickým stanovením mykobakterií je barvení auraminem [34].

⁴ Tuberkulom – ložisko tvořené nakupením *Mycobacterium tuberculosis* opouzdřené pojivem. Na RTG obrazu se obvykle zobrazuje jako dobře ohraničený solitární okrouhlý útvar.



Obrázek 4 – *Mycobacterium tuberculosis* po barvení dle Ziehl-Neelsena; řez plicí postižených TBC [35].

Kultivační metody

Vzhledem ke schopnosti mykobakterií produkovat pigmenty (viz kapitola **2.1.3 Rozdělení mykobakterií**) patří mezi nejčastěji používané metody detekce mykobakterií kultivace jak v tekutých, tak i na tuhých kultivačních médiích.

Rychle rostoucí mykobakterie tvoří viditelné kolonie do sedmi dnů. V případě pomalu rostoucích mykobakterií se však jedná o časově náročnou metodu (zpravidla 3 – 4 měsíce), což může hrát významnou roli při zahájení léčby již probíhající infekce [34][36].

Další komplikací při kultivaci mykobakterií může být přítomnost jiných bakteriálních druhů ve vzorku. Za tímto účelem je vhodné nejdříve provést dekontaminaci analyzovaného vzorku tak, aby byl potlačen růst ostatních mikroorganismů, ale byla zachována vitalita mykobakterií. Jednou z užívaných kontaminací kontrolujících látek je např. N-acetyl-L-cystein a 2% roztok NaOH [34].

Dekontaminovaný vzorek je očkovan na vhodná tekutá nebo pevná média. Mezi nejužívanější tekutá média je řazeno např. Middlebrook 7H9; pro kultivaci na pevných médiích je používáno Löwenstein-Jensen médium s vaječným základem nebo Middlebrook 7H10 a 7H11 médium s agarovým základem [2][34][37].

Rychle rostoucí mykobakterie by měly být inkubovány při teplotách 28 – 30 °C. Klinicky významné pomalu rostoucí NTM vyžadují kultivační teplotu v rozmezí 35 – 37 °C, najdou se však i výjimky, např. *M. marinum* s kultivačním optimem 30 – 33 °C [2].

Biochemické metody

Identifikace mykobakteriálních izolátů pomocí biochemických charakteristik probíhá na základě sledování např. ureázové aktivity, hydrolýzy Tweenu 80, produkce niacinu, nitrát reduktázy, kyselé fosfatázy, katalázy, α -esterázy, pyrazinamidázy, arylsulfatázy aj. [34]

Dalším možným přístupem je sledování růstu izolátu za přítomnosti různých látek, jako je např. NaCl nebo isoniazid [34].

2.3.2 Molekulárně diagnostické metody

Kultivační a biochemické metody detekce a identifikace mykobakterií na základě fenotypových charakteristik jsou velmi zdoluhavé a často nepřesné. Fenotyp mykobakteriálních kultur je totiž nestálý, často proměnlivý v závislosti na kultivačních podmínkách [38]. Rozlišení širokého spektra NTM pomocí těchto metod je proto dnes prakticky nemožné.

Během dlouholetého výzkumu byl pozorován velký potenciál polymerázové řetězcové reakce (PCR), při které dochází ke zmnožení vybrané specifické oblasti DNA, podle které je potom možné určit a rozlišit určité bakteriální komunity.

Na základě PCR proto byly vyvinuty molekulárně diagnostické metody (*Tabulka 1*), které rychleji, citlivěji a přesněji detekují mykobakterie a jsou používány pro rozlišení jednotlivých mykobakteriálních druhů ve vzorku [34].

Tabulka 1 – Přehled metod pro detekci a identifikaci jednotlivých mykobakteriálních druhů.

Rozlišení mykobakterií	Gen	Metoda	Reference
<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>16S rRNA</i>	PCR-REA multiplex PCR	Thierry et al., 1990 [39] Wilton and Cousins, 1992 [40]
	ITS	PCR-REA	Roth et al., 2009 [41]
	<i>dnaJ</i>	konvenční PCR	Nagai et al., 1990 [42]
MTC	<i>IS6110</i>	konvenční PCR real-time PCR RFLP	Thierry et al., 1990 [39] Niemann et al., 1999 [43] Lemaitre et al., 2004 [44]
	<i>rpoB</i>	multiplex PCR	Mokkadas&Ahmad, 2007 [45]
MAC	<i>IS1245</i>	konvenční PCR real-time PCR RFLP	Guerrero et al., 1995 [46] Slana et al., 2010 [47] Ritacco et al., 1998 [48]
MAP	<i>IS900</i>	konvenční PCR real-time PCR RFLP	Green et al., 1989 [21] Slaná et al., 2008 [8] Pavlik et al., 1999 [49]
	<i>F57</i>	real-time PCR	Slana et al., 2008 [8]
	<i>16S rRNA</i>	multiplex PCR	Wilton and Cousins, 1992 [40]
<i>M. marinum</i> skupina	<i>erp</i>	real-time PCR	Salati et al., 2010 [50]
<i>M. ulcerans</i>	<i>IS2404</i>	konvenční PCR real-time PCR	Stinear et al., 1999 [51] Fyfe et al., 2007 [52]
	<i>IS2606</i>	konvenční PCR real-time PCR	Stinear et al., 1999 [51] Fyfe et al., 2007 [52]

vysvětlivky: PCR-REA ... polymerázová restrikční analýza

RFLP... polymorfismus délky restrikčních fragmentů

Detekční sady založené na hybridizačních sondách

V současné době je k dispozici několik detekčních setů, založených na hybridizačních sondách, které jsou využívány pro identifikaci NTM v izolátech.

AccuProbe (GenProbe; USA) využívá k identifikaci mykobakterií hybridizaci chemiluminiscenčně značené DNA sondy se specifickou oblastí genu pro *16S rRNA*. Výhodou této detekční sady je detekce NTM přímo v lyzátu kultury bez nutnosti PCR amplifikace. Použití tohoto testu je však omezené na identifikaci MTC, MAC, *M. goodii*, *M. intracellulare* a *M. kansasii* [34][45].

Větší uplatnění našly detekční sady využívající reverzní hybridizaci PCR produktu na nitrocelulózovém proužku s navázanými sondami, které jsou specifické pro několik mykobakteriálních druhů [34].

INNO-LIPA test (Innogenetics; BEL) je založen na amplifikaci DNA spojky mezi geny *16S rRNA* a *23S rRNA* (ITS). Umožňuje identifikaci 16 druhů mykobakterií včetně MTC [34][45].

GenoType Mycobacterium test (Hain Life science; DEU) využívá amplifikace specifické oblastí genu pro *23S rRNA*. Na trhu jsou dostupné dvě sady těchto testů – CM sada umožňuje identifikaci MTC a 14 nejčastěji se vyskytujících NTM; AS sada rozšiřuje základní sadu o dalších 16 méně běžných NTM [33][34][45].

Specifická detekce mykobakterií

Díky vývoji a aplikaci nástrojů bioinformatiky byly odhaleny DNA lokusy unikátní pro některé mykobakteriální druhy. To umožnilo vývoj specifických real-time PCR metod pro jejich detekci [33]. Příkladem takových vysoce specifických genů jsou např. lokusy *IS900* a *F57* vyskytujících se pouze u *M. avium* subsp. *paratuberculosis* nebo sekvence *IS901* identifikována u *M. avium* subsp. *avium* [53].

Výhodami specifické detekce mykobakterií oproti klasickým kultivačním metodám jsou vysoká specifita, rychlost a citlivost. K dalším výhodám real-time PCR (qPCR) analýzy patří nepochybně určení množství mykobakteriálních buněk, což umožní stanovit míru kontaminace analyzovaného vzorku, čehož lze využít pro sledování průběhu onemocnění během antibiotické léčby [53].

Gen *erp*

Gen *erp* kóduje *Erp* protein (exported repetitive protein) patřící do rodiny extracelulárních proteinů, které jsou charakteristické pro rod *Mycobacterium*, [54] a lze jej proto využít k jejich detekci pomocí molekulárně biologických metod. Protein byl původně popsán pouze u zástupců MTC, ale během následujících analýz byl tento gen prokázán u fylogeneticky příbuzných mykobakteriálních druhů. Samotný protein slouží mykobakteriím k přežití v makrofázích a pro intracelulární růst buněk [55].

Na základě sekvenční analýzy genu *erp* byla navržena druhově specifická metoda qPCR, která je používána pro detekci zástupců skupiny *M. marinum* (MMS). Tato skupina zahrnuje druh *M. marinum*, který je původcem systémové infekce u ryb a také kožních mykobakterióz u pacientů popisujících kontakt s prostředím akvarijního chovu ryb [56]. Dalšímu zástupci jsou mykobakterie produkující mykolaktony (*M. pseudoshottsii*, *M. shottsii* a *M. ulcerans*), které se vyvinuly z *M. marinum* progenitoru příjmem plazmidu a redukční evolucí.

Širokospektrá detekce mykobakterií s následnou sekvenční analýzou

Mykobakterie vykazují vysokou mezidruhovou shodu DNA sekvencí a u většiny z nich zatím nebyl detekován specifický DNA lokus vhodný pro přímou detekci. V takovém případě je možno pro detekci NTM využít genů, které jsou přítomné ve všech prokaryotech a identifikaci poté provést pomocí rodově specifických primerů s následnou sekvenční analýzou. Pro tento účel se ukázaly jako vhodné geny pro *16S rRNA*, transkripčně přepisovaná spojka mezi geny *16S rRNA* a *23S rRNA* (ITS), *hsp65* nebo *rpoB* [34][45][57].

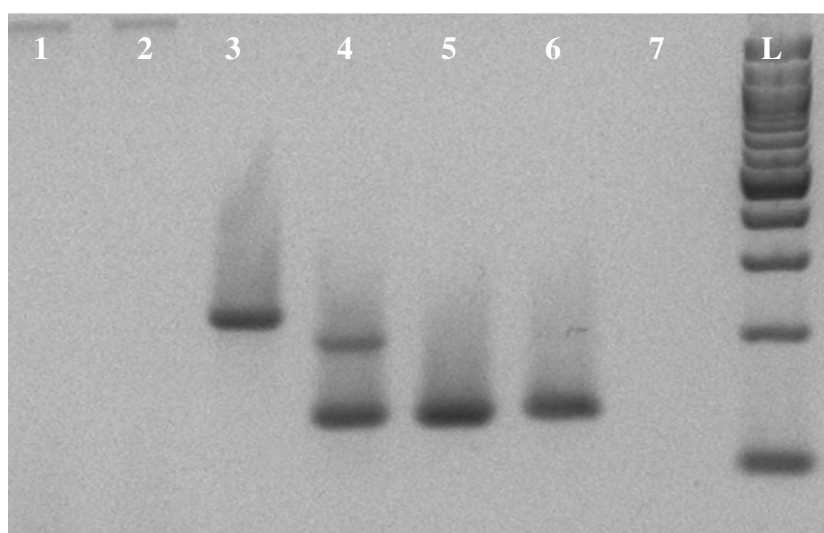
Gen 16S rRNA

Sekvenční analýza využívá PCR amplifikace DNA, která je izolována z bakteriální kultury nebo přímo z biologického materiálu. Pomocí širokospektré PCR je namnožena rodově specifická oblast pro mykobakterie. Za zlatý standard v klinické diagnostice je považována analýza genu pro 16S rRNA. Získaná primární sekvence analyzované oblasti je srovnána pomocí algoritmu „blastn“ se sekvencemi uloženými ve veřejně dostupných databázích (např. <http://www.eztaxon-e.org>; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/; rRNA2.ridom.de/). Příslušný mykobakteriální druh je následně identifikován podle sekvenční shody [34].

MTC duplex PCR – gen *rpoB*

Metodika MTC duplex souží k identifikaci izolátů *Mycobacterium* sp. a ke specifickému rozlišení zástupců MTC od ostatních mykobakteriálních druhů na základě amplifikace genu *rpoB*. Gen *rpoB* se vyskytuje u všech druhů bakterií rodu *Mycobacterium* a kóduje beta podjednotku RNA polymerázy [33][58].

Délka výsledného ampliconu je 235 bp pro MTC, 136 bp pro ostatní mykobakterie, popřípadě někteří zástupci prezentují další amplicon o velikosti 203 bp [58] (**Obrázek 5**).



Obrázek 5 - Reprezentativní agarózový gel znázorňující amplifikované produkty z PCR reakce MTC duplex u různých bakterií; 1: *E. coli*, 2: *S. aureus*, 3: *M. tuberculosis*, 4: *M. kansasii*, 5: *M. a. hominissuis*, 6: *M. chelonae*, 7: *K*, L: velikostní standard 100 bp DNA.

pozn. Obrázek byl experimentálně získán v laboratořích Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně (VÚVeL).

nevýhody širokospektré detekce mykobakterií

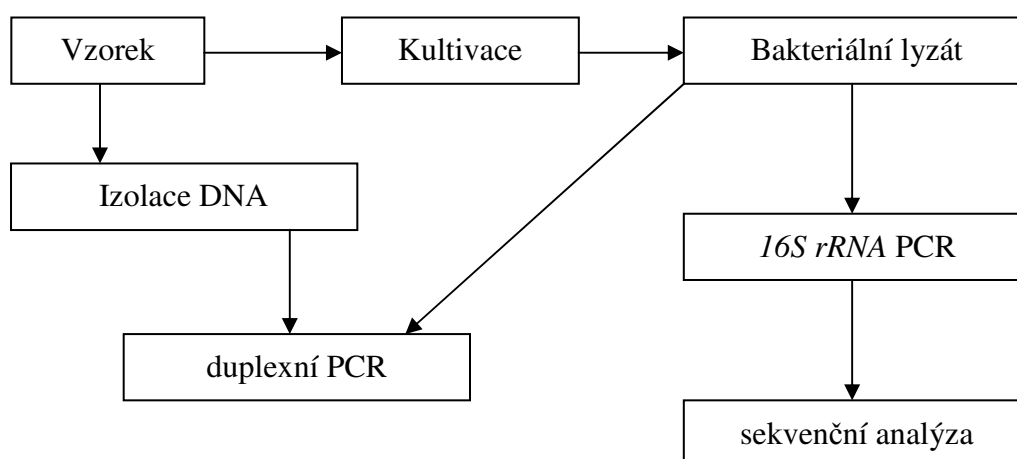
Širokospektrá detekce mykobakterií má však také svá úskalí. Prvním z nich je analýza směsného vzorku, kdy je vzorek kontaminován jinými bakteriálními druhy [34][59]. Směsný vzorek může být vytvořen během izolace, kdy je kontaminován DNA z bakteriálního genomu během samotného procesu, nebo v případě, že je pacient infikován více bakteriemi [34]. Tyto

potíže lze vyřešit úpravou izolačního postupu a v případě směsného vzorku je potom přímá sekvence neúspěšná a informace je nutné získat nepřímým způsobem, např. vytvořením knihovny *16S rRNA* klonů [34][60].

Druhé omezení je spojeno s nedostatečným množstvím sekvencí ve veřejných databázích, které mohou obsahovat neúplné, špatně charakterizované nebo chybné sekvence [34].

Schéma detekce a identifikace mykobakteriálních druhů

Při samotné detekci a identifikaci mykobakterií je postupováno podle následujícího algoritmu:



2.4 Bezpečnost potravin

Se vzrůstajícím počtem pacientů, u kterých propuklo závažné mykobakteriální onemocnění, se začali vědci zabývat prověřováním potravin jako možným zdrojem nákazy. Proto proběhlo několik studií zaměřujících se na detekci a identifikaci NTM v potravinách, popřípadě surovinách, které jsou běžně používány pro výrobu potravin, ať už se jedná o živočišné nebo rostlinné materiály. V současné době se také mluví o *MAP* jako o možném původci Crohnovy choroby, chronickém zánětu tlustého střeva u lidí [61].

Nejvíce zkoumaným potenciálním nebezpečím je výskyt *MAP* v mléce a masě z hovězího dobytka. Riziko kontaminace mléčných a masných výrobků je přímo spojeno s rozsahem infekce v postiženém kusu dobytka a také s podmínkami ustájení, kde hrozí nebezpečí fekálního znečištění mléka. Samotným kritickým bodem pro omezení kontaminace mléka, masa, mléčných a masných výrobků jsou proto farmy, na nichž je dobytek chován, a jatky, kde je porážen [62].

mléko a mléčné výrobky

Možným potenciálním potravinovým zdrojem *MAP* je kravské mléko. Surové mléko je obvykle kontaminováno dojnicí, která trpí paratuberkulózou, nebo křížovou kontaminací při nesprávném skladování mléka po nadojení.

Počet *MAP* v mléce je obvykle redukován tepelným ošetřením mléka. Byl však zaznamenán výskyt nativních buněk *MAP* v komerčně pasterizovaném mléce. Není prokázáno, zda je neúčinný pasterizační proces nebo došlo ke kontaminaci při pozdější manipulaci. Podle nejnovějších poznatků neohrožuje malé množství mykobakteriálních buněk mikrobiologickou bezpečnost pasterizovaného mléka [7][8].

Pasterizované mléko je výchozí surovinou pro výrobu másla, zmrzliny, sýra typu cottage, jogurtů, zrajících sýrů aj. Obecně se má za to, že mléčné výrobky vyrobené z pasterizovaného mléka nejsou zdravotně závadné. Komise pro mikrobiologickou nezávadnost (USA) uvedla, že během pasterizačních a zrajících procesů je hladina *MAP* dostatečně zredukována a potravina je tak považována za zdravotně nezávadnou [7].

maso a masné výrobky

MAP je původcem systémového onemocnění hovězího dobytka (viz kapitola **2.2.2 Paratuberkulóza – Johnho choroba**), proto jsou především mleté hovězí maso a vnitřnosti možným zdrojem nákazy *MAP*. Zvýšený počet vitálních buněk *MAP* je předpokládán v tepelně neopracovaných výrobcích, např. mleté hovězí maso na tatarský biftek, apod. Vzhledem ke skutečnosti, že syrové maso je konzumováno v menší míře než mléko a mléčné výrobky, představuje mléčný skot větší riziko pro přenosu *MAP* do lidského organismu [7].

MAP je přítomen v odpadech ze statků a farem (např. vodní odpad, chlévská mrva aj.), kde je chován dobytek. Tento odpad může kontaminovat vodní zdroje a nádrže, kde jsou chovány ryby, a hrozí riziko nákazy. Zatím však nebyly zaznamenány případy infekce ryb způsobených *MAP* [7].

ostatní zdroje nákazy

Mykobakterie patří mezi mikroorganismy přirozeně se vyskytující v okolí člověka, především ve vodních systémech a půdách. Mykobakterie byly nalezeny v přírodních a pitných vodách, v potrubí rozvádějícím vodu v budovách, v horkých lázeňských vřídlech aj. [5] Voda patří mezi zdroje, s nimiž člověk přichází každodenně do styku, proto vodní systém představuje velké nebezpečí pro infekci právě NTM.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a pomůcky

přístroje

- Biohazard box MSC 12; Trigon plus, CZE
- Box pro PCR; Aura PCR, Bio Air Instruments, ITA
- Centrifuga E-centrifuge 100-240 V; Wealtec Corp., USA
- Centrifuga MiniSpin[®] Plus; Eppendorf Czech&Slovakia, CZE
- Centrifuga SIGMA 1-15; Sartorius Stedim Biotech S.A., FRA
- Centrifuga 5424; Eppendorf Czech&Slovakia, CZE
- Elektroforetická vana Owl EasyCast[™] B1A; Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- Elektroforetická vana Owl EasyCast[™] B2; Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- Digitální fotoaparát Canon PowerShot G5; Canon Czech Republic, CZE
- Chladnička ARDO MPC 200A; ARDO, CZE
- Chladnička Liebherr Premium; MC Tree a.s., CZE
- Kompresor pro pipetu na sypké hmoty; Jemná mechanika – elektro Brno, CZE
- Laboratorní váha OHAUS Pioneer PA213M; OHAUS[®], CHE
- Laminární box; Aura Mini, Bio Air Instruments, ITA
- LightCycler 480 systém; Roche Molecular Diagnostic, DEU
- MagNA lyser Instrument; Roche Molecular Diagnostic, DEU
- Mikrovlnná trouba GALANZ; Guangdong Galanz Group Co., Ltd., CHN
- Mrazák VXE 57; JOUAN, FRA
- Mrazák SANYO Ultra Low; Schoeller Instruments, CZE
- NanoDrop 2000c Spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- Napájecí zdroj Powerpac[™] 300 Basic; Bio-Rad Laboratories s.r.o., USA
- Suchá lázeň Isotemp 145D Digital; Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- Suchá lázeň Techne[®] Dri-Block[®]; MERCI, CZE
- Thermal Cycler DNA Engine Dyad[®] Dual-Bay; Bio-Rad Laboratories s.r.o., USA
- Třepačka a suchá lázeň Thermomixer Comfort; Eppendorf Czech&Slovakia, CZE
- Třepačka a suchá lázeň Thermomixer Compact; Eppendorf Czech&Slovakia, CZE
- Třepačka VORTEX IKA MS 3 Basic; MERCI, CZE
- UV lampa PROLUX GM 55W SPH01; PROMOS s r.o., SVK
- UV Transluminator Spectroline[®]; Spectronics Corporation, USA

ostatní laboratorní pomůcky

- Alobal
- Běžné laboratorní skleněné a plastové pomůcky
- Centrifugační zkumavky SuperClear[®] 50 ml; VWR, USA
- EU Thin-Wall 8-Tube Strip 0,2 ml; Bioplastics, NLD
- Manuální pipeta Finnpiette obj. 1-10 µl; Thermo Fisher Scientific Inc., USA

- Manuální pipeta Finn timer obj. 10-100 µl; Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- Manuální pipeta Finn timer obj. 100-1000 µl; Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- Mikrozskumavky se šroubovacím uzávěrem 2 ml PP; SARSTEDT s r.o., CZE
- Operační masky s bakteriálním filtrem Foliodress® Mask Protect, Hartmann-Rico a.s., CZE
- Špičky s filtrem TF-10-L-R-S; Axygen, USA
- Špičky s filtrem TF-100-L-R-S; Axygen, USA
- Špičky s filtrem TF-1000-L-R-S; Axygen, USA
- Tlakový hrnec
- Vyšetřovací rukavice DERMAGRIP, latexové, nepudrované; WRP, MYS
- Zirkoniové kuličky 0,1 mm; Biospec, USA

3.2 Chemikálie

- Agaróza; Serva, DEU
- Destilovaná voda
- TOPO TA Cloning Kit; Qiagen, DEU
- DNA Remover™, DNA Decontamination Spray; Minerva BioLabs GmbH, DEU
- DNA z rybích spermií; Serva, DEU
- DNeasy® Blood&Tissue Kit; Qiagen, DEU
- DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit 2x; Finnzymes, FIN
- Etylalkohol absolutní p.a.; Penta, CZE
- Ethidium bromid; Ambresco, USA
- Guttar - alkoholový roztok pro desinfekci ploch postřikem; MPD plus, s.r.o., CZE
- Kanamycin (300 mg kanamycinu; 10 ml destilované vody); Sigma Aldrich, USA
- 5x KCM (0,32 g KCl; 0,51 g MgCl₂ x 6 H₂O; 0,22 g CaCl₂ x 2 H₂O; 10 ml destilované vody)
- LB agar; LB agar Miller, Difco, USA
- LB bujón; LB agar Miller, Difco, USA
- PCR voda; TopBio, CZE
- QIAprep® Spin Miniprep Kit; Qiagen, DEU
- QIAquick® PCR Purification Kit; Qiagen, DEU
- SOC médium (2,0 g Tryptonu; 0,5 g kvasničného extraktu; 0,05 g NaCl; 1,0 ml KCl; 2 ml glukózy; 0,5 ml MgCl₂ x 6 H₂O; 96,5 ml destilované vody)
- 20x SB pufr (8,0 g NaOH; 45,0 g H₂BO₃; 1,0 l destilované vody)
- TE pufr; Ambresco, USA
- Uracil-DNA Glycosylase; Roche Molecular Diagnostic, DEU
- Velikostní standard 50 bp DNA Ladder; New England BioLabs, GBR
- Velikostní standard 100 bp DNA Ladder; New England BioLabs, GBR
- Voda pro injekce; B. Braun, DEU
- 5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranosidase (20,0 mg X-gal; 10 ml destilované vody); Sigma Aldrich, USA

3.3 Vyšetřované vzorky

V rámci diplomové práce bylo vyšetřeno celkem 194 vzorků z 11 druhů ryb (100 kusů); podrobnější rozpis je uveden v **Tabulce 2**. Pro účely diplomové práce byly vzorky sesbírány ve čtyřech brněnských supermarketech a v nádržích používaných pro komerční chov ryb na rybích farmách.

Tabulka 2 - Podrobný rozpis vyšetřovaných vzorků

Ryba	Počet vzorků	Počet vyšetřených ryb	Vyšetřované orgány
Tilapie nilská <i>Oreochromis niloticus</i>	78	24	žábry, pažerákové zuby, játra, střevo, sval
Candát obecný <i>Sander lucioperca</i>	42	17	žábry, vnitřní orgány, střevo, sval
Lín obecný <i>Tinca tinca</i>	21	6	žábry, vnitřní orgány, střevo, sval
Okoun říční <i>Perca fluviatilis</i>	5	5	sval
Amur bílý <i>Ctenopharyngodon idella</i>	6	6	sval
Kapr obecný <i>Cyprinus carpio</i>	14	14	sval
Pangas spodnooký <i>Pangasius hypophthalmus</i>	8	8	sval
Pstruh duhový <i>Oncorhynchus mykiss</i>	10	10	sval
Tolstolobik bílý <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	6	6	sval
Siven dravý <i>Salvelinus fontinalis</i>	2	2	sval
Mřenka mramorovaná <i>Barbatula barbatula</i>	2	2	sval

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Izolace bakteriální DNA z živočišné tkáně

Izolace DNA je založena na pozměněném protokolu QIAamp DNeasy[®] Blood&Tissue Kit. Doporučený postup od výrobce byl rozšířen o mechanickou homogenizaci mykobakteriálních buněk pomocí zirkoniových kuliček v přístroji MagNA Lyser.

Bylo naváženo 40 – 50 mg vzorku živočišné tkáně, ke kterému bylo přidáno 350 mg zirkoniových kuliček, 100 µl Proteinázy K (10 U.ml⁻¹) a 360 µl ATL pufru. Směs byla

inkubována při $T = 56\text{ }^{\circ}\text{C}$ za stálého třepání při $ot = 1400\text{ rpm}$, dokud nebyla tkáň zcela rozpuštěna (zpravidla po dobu $t = 2$ hodiny).

K rozpuštěnému vzorku bylo přidáno $400\text{ }\mu\text{l}$ AL pufru, směs byla důkladně homogenizována za použití vortexu a inkubována po dobu $t = 10\text{ min}$ při $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mykobakteriální buňky byly rozrušeny v MagNA Lyseru při $ot = 6\,400\text{ rpm}$ po dobu $t = 60\text{ s}$. Vzniklá suspenze byla krátce centrifugována („Short spin“).

Bylo přidáno $400\text{ }\mu\text{l}$ nedenaturovaného etanolu (96 %). Po důkladném promíchání byl obsah zkumavky ještě 3x promíchán pipetou a $600\text{ }\mu\text{l}$ roztoku bylo nanášeno na membránu kolonky, které byly centrifugovány při maximálním úhlovém zrychlení ($\varepsilon = 14\,100\text{ g}$) po dobu $t = 60\text{ s}$. Obsah sběrné zkumavky byl vylit a krok byl znovu opakován. Purifikační kolonka byla umístěna do nové sběrné zkumavky a byla zachycena mykobakteriální DNA, byla 2x promyta $500\text{ }\mu\text{l}$ AW1 pufru a centrifugována při maximálních otáčkách po dobu $t = 60\text{ s}$. Kolonka s membránou byla po druhém promytí umístěna do nové sběrné zkumavky a za stejných podmínek byla promyta 2x $500\text{ }\mu\text{l}$ AW2 pufru. Kolonka byla po druhém promytí umístěna do nové sběrné zkumavky.

Izolovaná DNA byla eluována do $100\text{ }\mu\text{l}$ TE pufru předehřátého na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 3 minutách byla zkumavka centrifugována při $\varepsilon = 6\,100\text{ g}$ po dobu $t = 60\text{ s}$. Získaný filtrát byl nanášen na membránu kolonky, centrifugován při $\varepsilon = 6\,100\text{ g}$ po dobu $t = 60\text{ s}$. Roztok s purifikovanou DNA byl přenesen do malých zkumavek.

3.4.2 MTC duplex PCR

Byla připravena PCR reakční směs dle *Tabulky 3*. Byla provedena MTC duplex PCR reakce pro zjištění přítomnosti amplikonu genu *rpoB* v jednotlivých vzorcích (teplotní profil reakce je uveden v *Tabulce 4*). V reakci byly použity dvě sady primerů, specifické pro MTC a NTM, o sekvencích [45]:

NTMR: 5' – CAGCGGGTTGTTCTGGTCCATGAAC – 3'

NTMF: 5' – GGAGCGGATGACCACCAGGACGTC – 3'

MTCR: 5' – ACAGTCGGCGCTTGTGGGTCAAC – 3'

MTCF: 5' – TACGGTCGGCGAGCTGATCCAAA – 3'

Po ukončení PCR programu byly vzorky nanášeny na 2% agarózový gel a byla provedena elektroforéza při $U = 120\text{ V}$, $I = 400\text{ A}$ a $t = 40\text{ min}$. Jako pozitivní kontroly byly použity standardy připravené klonováním PCR produktu získaného z *M. tuberculosis* a *M. kansasii*.

Tabulka 3 – Složení PCR směsi pro reakci MTC duplex

Komponenty PCR směsi		V [μl]
Voda		4,6
2x Master mix FastStart		10,0
Primery (100 pmol.μl ⁻¹)	MTCF	0,1
	MTCR	0,1
	NTMF	0,1
	NTMR	0,1
DNA		5,0
Celkem		20,0

Tabulka 4 – Teplotní profil PCR reakce MTC duplex

Kroky PCR reakce		T [°C]	t [min, s]
Úvodní denaturace		95	3 min
		97	1 min
Denaturace	2 cykly	95	1 min
Annealing		64	30 s
Extenze		72	1 min
Denaturace	2 cykly	95	1 min
Annealing		62	30 s
Extenze		72	1 min
Denaturace	2 cykly	95	1 min
Annealing		60	30 s
Extenze		72	1 min
Denaturace	2 cykly	95	1 min
Annealing		58	30 s
Extenze		72	1 min
Denaturace	22 cyklů	95	1 min
Annealing		56	30 s
Extenze		72	1 min
Finální extenze		72	10 min
Zchlazení		12	10 min

3.4.3 Klonování – příprava standardů pro MTC duplex PCR

Postup přípravy standardů pomocí klonování je prováděn pomocí TA TOPO Cloning Kitu dle návodu výrobce. Proces se skládá z ligace čerstvě připraveného PCR produktu do plazmidového vektoru, transformace takto připraveného plazminového konstruktu chemokompetentních buněk, ověření pozitivních kolonií PCR reakcí a sekvenční analýzy. Chemokompetentní buňky *Escherichia coli* (TOP10) byly připraveny pracovníky výzkumného ústavu již dříve a zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ligace (spojení plazmidu a čerstvě připraveného PCR produktu)

Do zkumavky byla připravena ligační směs podle **Tabulky 5**. Směs byla inkubována v termocykleru při $T = 14\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu $t = 2\text{ h}$.

Tabulka 5 – Složení ligační směsi

Komponenty ligační směsi	V [μl]
pDrive Cloning Vector ($50\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	1,0
PCR produkt	1,0
Destilovaná voda	3,0
2x Ligation Master Mix	5,0
Celkem	10,0

Příprava LB agaru s kanamycinem pro výsev klonovaných buněk

Plotny s 1,5% agarem byly připraveny dle následujícího postupu. Bylo naváženo 4 g LB agaru, který byl následně rozpuštěn v 100 ml destilované vody. Tekutý agar byl autoklávován v tlakovém hrnci po dobu $t = 30\text{ min}$ od dosažení bodu varu. Po ochlazení agaru na $T = 50 - 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo přidáno 300 μl kanamycinu o $c = 30,0\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, agar byl promíchán a rozlít na 5 Petriho misek.

Po zatuhnutí agarových ploten bylo na každou misku pipetováno 80 μl X-gal o $c = 20\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a roztoky byly důkladně rozetřeny mikrobiologickou hokejkou po celém povrchu plotny.

*Transformace (přenos plazmidových vektorů do hostitelské buňky *E. coli* TOP10)*

75 μl destilované vody bylo přidáno ke 100 μl chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10. K buňkám bylo pipetováno 20 μl 5x KCM a 5 μl ligační směsi. Takto připravená směs byla jemně promíchána pipetou. Směs byla inkubována po dobu $t = 20\text{ min}$ na ledu a $t = 10\text{ min}$ při laboratorní teplotě.

Následně bylo přidáno 800 μl SOC média a směs byla inkubována za stálého třepání (1 400 rpm) při $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu $t = 1\text{ h}$. Poté byla suspenze centrifugována po dobu

$t = 4$ min při $\varepsilon = 3\,300$ g. Vzniklá peleta byla rozsuspendována ve 100 μl supernatantu a tato suspenze byla následně vyseta na plotny s LB agarem.

Transformované buňky byly kultivovány přes noc v termostatu při $T = 37\,^{\circ}\text{C}$. Primární selekce narostlých kolonií byla provedena pomocí modro-bílého testu, Bílé kolonie byly poté přeočkovány na nové plotny LB agaru.

Ověřování klonů pomocí PCR

Z bílých kolonií byly připraveny lyzáty: kultura byla rozsuspendována ve 100 μl vody, povařena při $T = 98\,^{\circ}\text{C}$ po dobu $t = 20$ min v suchém bloku a poté centrifugována po dobu $t = 5$ min při $\varepsilon = 4\,300$ g.

Supernatant byl použit jako templát do PCR reakce s primery M13F40 a M13R (viz **Tabulka 6**). Teplotní nastavení použitého PCR programu je uvedeno v **Tabulce 7**.

Po ukončení PCR reakce byla provedena gelová elektroforéza na 2% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem při $U = 120$ V, $I = 400$ A a $t = 40$ min. Jako pozitivní kontrola byl použit plazmidový vektor bez insertu (vzniká PCR produkt o velikosti 250 bp).

Tabulka 6 – Složení PCR směsi pro ověření klonů

Komponenty PCR směsi	V [μl]
MasterMix Top Bio	10,0
P1 – M13F40 (10 pmol. μl^{-1})	1,0
P2 – M13R (10 pmol. μl^{-1})	1,0
Voda	6,0
DNA	2,0
Celkem	20,0

Pro ověřování klonů byly použity primery M13F40 a M13R o následujících sekvencích:

M13F40: 5' – GTTTTCCCAGTCACGAC – 3'

M13R: 5' – CAGGAAACAGCTATGAC – 3'

Tabulka 7 – Teplotní profil PCR reakce

Kroky PCR reakce		T [°C]	t [min, s]
Úvodní denaturace		95	3 min
Denaturace	30 cyklů	95	35 s
Annealing		50	30 s
Extenze		72	2 min
Finální extenze		72	5 min
Zchlazení		10	10 min

3.4.4 Sekvenování

Vzorek bylo nejprve nutné připravit pro sekvenování, tzn. získaný PCR produkt byl přečištěn, následně byla změřena koncentrace a čistota DNA ve vzorku.

16S rRNA PCR

Dle *Tabulky 8* byl připraven reakční mix pro *16S rRNA* PCR za použití specifických primerů o sekvencích [63]:

16S27F: 5' – AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3'

16S907R: 5' – CCGTCAATTCMTTTRAGTTT – 3'

PCR reakce probíhala za teplotního profilu uvedeného v *Tabulce 9*. Po amplifikaci následovala separace PCR produktů pomocí gelové elektroforézy při $U = 110$ V, $I = 400$ A a $t = 45$ min s využitím 1,5% agarózového gelu barveného ethidium bromidem.

Tabulka 8 – Složení PCR směsi s pro *16S rRNA* PCR reakci

Komponenty PCR směsi	V [μl]
MasterMix	20,0
P1 – 16S27F (100 pmol)	0,2
P2 – 16S907R (100 pmol)	0,2
Voda	15,6
DNA	4,0
Celkem	40,0

Tabulka 9 – Teplotní profil *16S rRNA* PCR reakce

Kroky PCR reakce		T [°C]	t [min, s]
Úvodní denaturace		95	4 min
Denaturace	35 cyklů	95	30 s
Annealing		53	30 s
Extenze		72	1 min
Finální extenze		72	7 min
Zchlazení		10	10 min

příprava vzorku pro sekvenování (přečištění PCR produktu)

Pro přečištění PCR produktů byl použit QIAquick® PCR Purification Kit. Všechny centrifugační kroky byly prováděny při $\varepsilon = 11\,300\text{ g}$ po dobu $t = 60\text{ s}$.

K jednomu objemovému dílu PCR směsi bylo přidáno pět objemových dílů pufru PB a obsah zkumavky byl důkladně promíchán. Roztok byl přenesen do purifikační kolonky ve sběrné zkumavce a centrifugován. Obsah sběrné zkumavky byl odstraněn, na kolonku bylo pipetováno 750 μl PE pufru a opět byla provedena centrifugace.

Kolonka s membránou byla umístěna do nové sběrné zkumavky. Přímo na membránu bylo nanášeno 50 μl injekční vody a zkumavka byla centrifugována.

sekvenování

U každého takto přečištěného PCR produktu byla změřena koncentrace a čistota DNA (přístroj Nanodrop 2000c). Po změření požadovaných parametrů byl obsah zkumavky rozdělen na dvě poloviny. Vzorky byly sušeny při $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ s otevřeným víčkem v tepelném bloku. Vysušené vzorky byly označeny a odeslány na komerční sekvenování do firmy MWG Biotech (DEU).

3.4.5 *erp* qPCR

příprava standardů pro *erp* qPCR

Pro přípravu qPCR standardů byl použit přečištěný rekombinantní plazmid obsahující cílovou oblast genu *erp*. DNA byla ředěna v TE pufru s DNA z rybích spermií ($50\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Postupovalo se desítkovým ředěním v rozsahu koncentrací 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 a 10^0 kopií plazmidu v 1 μl roztoku vzorku.

stanovení účinnosti izolace DNA *M. marinum* z tkání

Z připravených kultur kmene *M. marinum* byla připravena suspenze buněk v 300 μl injekční vody. Ze suspenze byla lineárně naředěna řada roztoků ($1\times - 100\,000\times$), kterou bylo kontaminováno 50 mg svaloviny pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*); (vždy 30 μl v triplikátech). Mykobakteriální DNA byla izolována dle protokolu uvedeného v kapitole **3.4.1 Izolace bakteriální DNA z živočišné tkáně**. Purifikovaná DNA sloužila jako templát pro *erp* qPCR, kde byl stanoven počet genomových ekvivalentů *erp* genu, tj. buněk *M. marinum*, získaných izolací z tkáně (opět v triplikátech). [26]

***erp* qPCR**

Pro detekci MMS byl použit qPCR systém založený na druhově specifické detekci genu *erp*. Pro kontrolu inhibice samotné reakce byla použita interní amplifikační kontrola (IAC) připravená ve formě plazmidu, do kterého byla pomocí hraničních sekvencí (primery pro detekci *erp*) klonována cDNA pocházející z genomu viru hepatitidy E [26]. Sekvence primerů a sond použitých pro detekci *erp* genu byly navrženy takto:

MAR_{erp}F: 5' – TTGGCAGGACGACAAGGTCA – 3'

MAR_{erp}R: 5' – ATGGTACGAGTGAGGTTGGTGA – 3'

MAR_{erp}Pr: 5' – FAM-TTGGACAACCCAAGCAGGCCCTAAGCA-BHQ – 3'

TqPr: 5' – HEX-CCGACAGAATTGATTTCGTCGGC-BHQ – 3'

vysvětlivky: Pr – sonda

BHQ – zhášec Black Hole Quencher

FAM – fluorofor 6-karboxy-fluorescein

HEX – fluorofor hexachloro-6-karboxy-fluorescein

Reakční qPCR směs byla připravena podle **Tabulky 10**. Teplotní profil *erp* qPCR je uveden v **Tabulce 11**. Každý vzorek byl stanoven v triplikátu. Jako pozitivní kontroly byly použity připravené standardy.

Získaná data byla použita pro stanovení kontaminace vzorku skupinou příbuznou *M. marinum* a účinnosti izolace mykobakteriální DNA ze vzorku živočišné tkáně.

Tabulka 10 - Složení směsi pro jednu *erp* qPCR reakci

Komponenty PCR směsi	V [μl]
PCR voda	4,05
2x DyNAmo™ Flash Probe qPCR	10,0
Primer MAR _{erp} F (100 pmol.μl ⁻¹)	0,1
Primer MAR _{erp} R (100 pmol.μl ⁻¹)	0,1
Sonda MAR _{erp} Pr (20 pmol.μl ⁻¹)	0,1
Sonda TqPr (10 pmol.μl ⁻¹)	0,35
UDG	0,2
IAC	0,1
DNA	5,0
Celkem	20,0

Tabulka 11 - Teplotní profil *erp* qPCR reakce

Kroky PCR reakce		T [°C]	t [min, s]
Úvodní denaturace		95	7 min
Denaturace	47 cyklů	95	10 s
Annealing		56	30 s
Extenze		72	10 s
Zchlazení		40	10 s

pozn.: Metodika samotná zatím nebyla publikována; manuskript je v recenzním řízení.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část práce byla provedena v laboratořích Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně, v.v.i. (VÚVeL, v.v.i.), oddělení Bezpečnosti potravin a krmiv. Pracoviště se zaměřuje především na výzkum bakteriálních a virových patogenů se zoonotickým potenciálem, mikrobiologii potravin, bezpečnost krmiv a výživu zvířat. Podílí se také na poradenské činnosti v oblasti bezpečnosti potravin a krmiv.

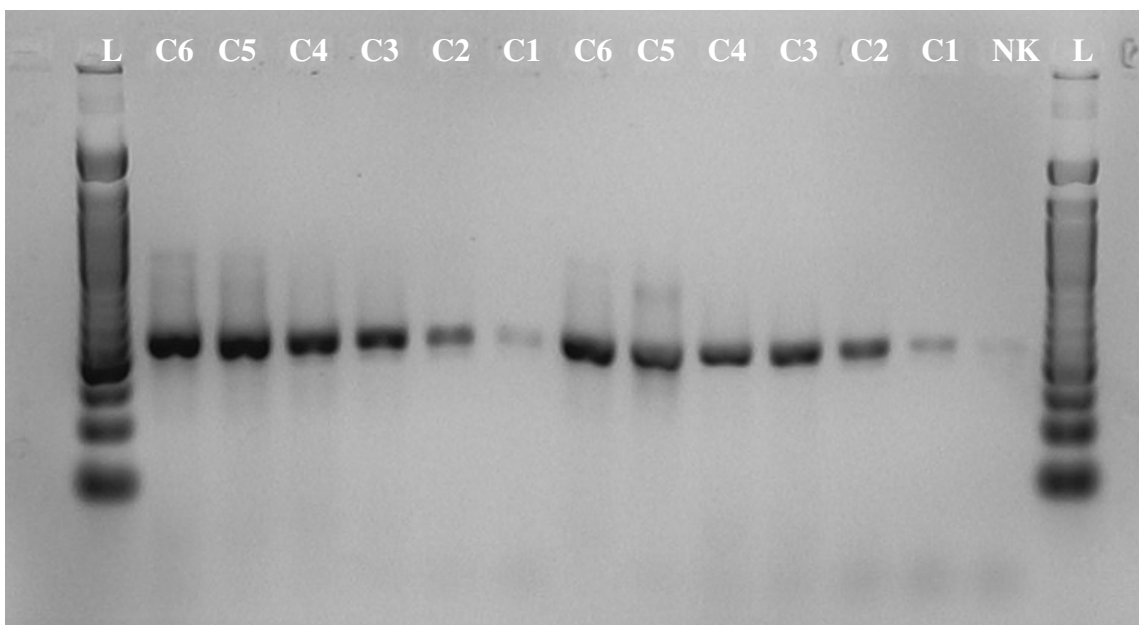
Oddělení disponuje širokým spektrem moderního přístrojového vybavení, které je používáno pro vývoj nových diagnostických metod, přístupů a doporučení, identifikaci virových a bakteriálních agens z různých biologických vzorků a vzorků prostředí, studium epidemiologie a patogeneze a testování rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám a stresovým faktorům [64].

4.1 Příprava standardů a stanovení limitu detekce MTC duplex PCR

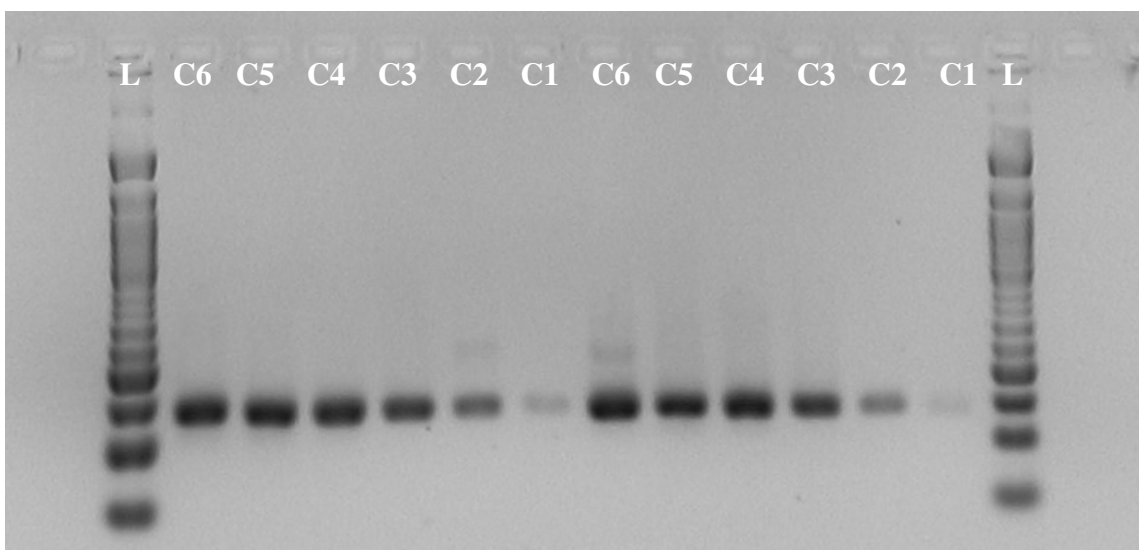
Pozitivní kontroly pro MTC duplex PCR připravené dle kapitoly 3.4.3 byly použity pro zjištění limitu detekce. Plazmidové standardy byly lineárně ředěny a připravená řada roztoků o výsledné koncentraci 5×10^6 – 5×10^1 kopií plazmidu byla nasazena na PCR reakci. Pro každou koncentraci byla provedena 4 opakování MTC duplex PCR.

Na **Obrázcích 6 a 7** jsou znázorněny ukázky výsledků gelové elektroforézy PCR produktů o velikosti 235 bp (náležící skupině MTC), respektive 136 bp (náležící skupině NTM), kde lze jasně pozorovat klesající intenzitu vizualizovaného produktu v závislosti na koncentraci nasazeného plazmidového standardu. Při použité koncentraci 5×10^1 kopií byl cílový fragment genu *rpoB* amplifikován pouze při 3 opakování PCR reakce.

Limit detekce MTC duplex PCR 5×10^2 kopií byl stanoven jako nejnižší koncentrace plazmidového standardu v reakci detekována ve všech 4 opakování.



Obrázek 6 – 2% agarózová elektroforéza 235 bp produktu MTC duplex PCR připraveného analýzou lineárně ředěného plazmidového standardu pro MTC v rozmezí koncentrací 5×10^6 – 5×10^1 (C6 – C1). L: velikostní standard 50 bp DNA; NK: negativní kontrola.



Obrázek 7 – 2% agarózová elektroforéza 136 bp produktu MTC duplex PCR připraveného analýzou lineárně ředěného plazmidového standardu pro MTC v rozmezí koncentrací 5×10^6 – 5×10^1 (C6 – C1). L: velikostní standard 50 bp DNA.

4.2 Stanovení účinnosti izolace mykobakteriální DNA *M. marinum* z živočišných tkání

Z uměle kontaminovaného masa pstruha duhového byla podle protokolu uvedeného v kapitole 3.4.1 izolována mykobakteriální DNA. Pomocí *erp* qPCR bylo stanoveno množství buněk *M. marinum* získaného izolačním postupem z kontaminované tkáně (B) a počáteční koncentrace buněk v suspenzi použité ke kontaminaci tkáně (A). Na základě těchto hodnot byla vypočtena účinnost izolace (C) podle vzorce:

$$C = \frac{B}{A} \cdot 100\%$$

Výsledky výpočtů jsou uvedeny v **Tabulce 11**. Medián účinnosti izolace byl vypočten jako 36,53 %. Účinnosti izolace nezávisí pouze na provedení samotného izolačního postupu, ale také na matrici, z níž je bakteriální DNA izolována. Vyšší účinnost izolace byla pozorována u jednodušších matric, jako jsou např. krev, sputum nebo mozkomíšní mok. U složitějších matric, kam jsou řazeny tkáně, trus či vzorky prostředí je účinnost izolace obecně nižší [65].

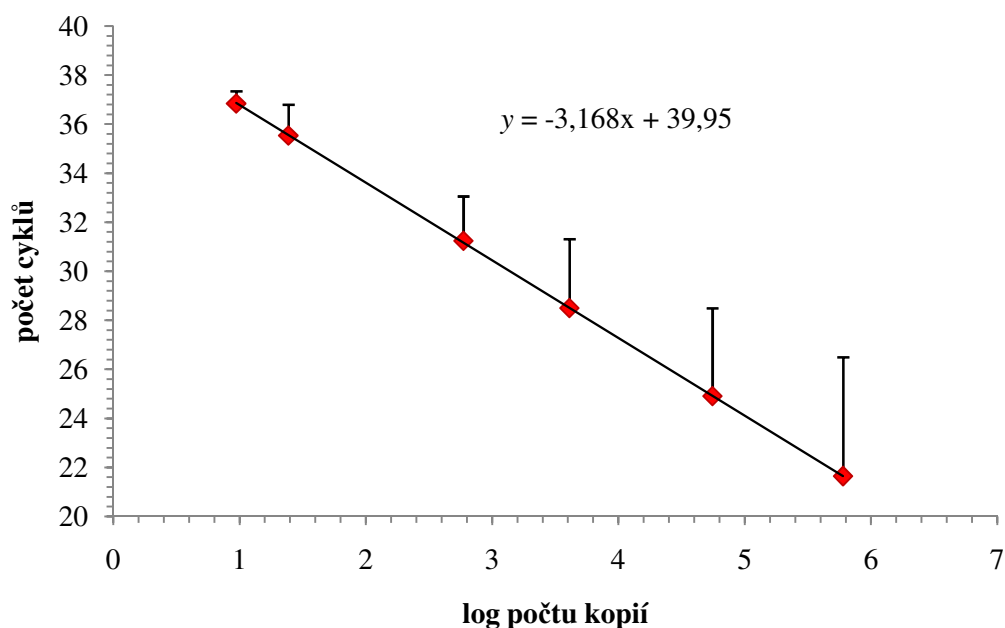
Tkáně, ať už se jedná o svalovinu, pažerákové zuby či vnitřní orgány ryb, jsou velmi složitá matrice. K jejich rozpuštění je zapotřebí delší časový úsek, v případě pažerákových zubů často nedošlo k úplnému rozpuštění. Izolovaná DNA také mohla ulpět na kosterních strukturách, na zirkoniových kuličkách nebo na stěnách používaných zkumavek, čímž došlo ke snížení celkového výtěžku izolace.

V **Grafu 2** je znázorněná kalibrační křivka umožňující kvantifikaci genových ekvivalentů *erp* v pozitivním vzorku.

Tabulka 12 - Stanovení účinnosti izolace DNA *M. marinum* z tkání pomocí *erp* qPCR

Množství buněk <i>M. marinum</i> použité ke kontaminaci tkáně [kopie.μl ⁻¹]		Množství buněk <i>M. marinum</i> po izolaci DNA z tkáně [kopie.μl ⁻¹]		Pozitivní opakování/ počet opakování	Účinnost izolace DNA [%]	Medián účinnosti izolace DNA [%]
Průměr	SO	Průměr	SO			
3,60 x 10 ⁸	1,33 x 10 ⁸	1,34 x 10 ⁸	7,82 x 10 ⁶	3/3	37,30	36,53
1,68 x 10 ⁷	6,75 x 10 ⁶	4,61 x 10 ⁶	7,47 x 10 ⁵	3/3	27,42	
1,24 x 10 ⁶	3,01 x 10 ⁵	4,43 x 10 ⁵	5,99 x 10 ⁴	3/3	35,76	
8,24 x 10 ⁴	1,98 x 10 ⁴	2,51 x 10 ⁴	3,36 x 10 ³	3/3	30,52	
2,66 x 10 ³	8,91 x 10 ²	1,10 x 10 ³	2,56 x 10 ²	3/3	41,38	
6,14 x 10 ²	2,63 x 10 ²	4,03 x 10 ²	1,28 x 10 ²	3/3	65,70	

Graf 2 -Kalibrační křivka získaná z lineárního ředění plazmidové DNA pro *erp* qPCR reakci.



4.3 Sledování výskytu a distribuce mykobakterií v orgánech sladkovodních ryb z našich povrchových vod

V rámci diplomové práce bylo vyšetřeno celkem 30 vzorků sladkovodních ryb vyskytujících se v našich povrchových vodách. Ze vzorků byla izolována mykobakteriální DNA a byla provedena analýza přítomnosti NTM pomocí širokospektré detekce MTC duplex PCR a specifické *erp* qPCR na prokázání kontaminace vzorků MMS. K vyšetření byly k dispozici vzorky žáber, pažerákových zubů, svaloviny, střev a vnitřních orgánů.

analýza genu *rpoB*

Jak je patrné z **Tabulky 12**, nejčastějším místem nálezu NTM u vzorků z tilapií nilských byla žábry ($n = 17$ ryb), což poukazuje na kontaminaci z vnějšího prostředí; NTM se totiž běžně vyskytují v přírodních vodních zdrojích [5]. U 13 tilapií nilských byly vyšetřovány také pažerákové zuby, které slouží k drcení potravy. V 11 případech byla potvrzena přítomnost NTM a s největší pravděpodobností se jedná taktéž o kontaminaci z vnějšího prostředí (voda, přijímaná potrava).

Ve 14 případech ze 17 vyšetřovaných kusů ryb tilapií nilských byl pozitivní nález ve střevech, 8 pozitivních nálezů ve svalovině a žádný pozitivní nález v játrech. Zde už lze hovořit o infekci sledovaných ryb.

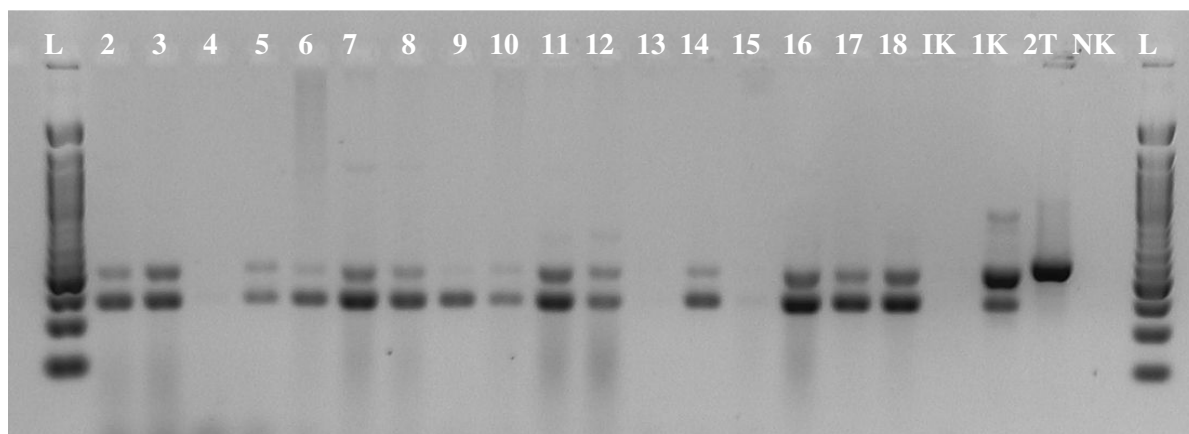
Obrázek 8 znázorňuje ukázkou elektroforegramu, kde jsou zvýrazněny amplikony genu *rpoB*. V běžích 2 – 18 lze vidět pozitivní nálezy na přítomnost *rpoB* genu náležícího NTM.

Tabulka 13 ukazuje výsledky vyšetření candáta obecného a lína obecného ($n = 13$ ryb), což jsou ryby běžně se vyskytující v českých povrchových vodách. V porovnání se sadou vzorků tilapií nilských zde lze pozorovat nižší výskyt kontaminace jak v žábřích, tak ostatních zkoumaných orgánech. V 7 případech byla prokázána přítomnost genu *rpoB* v žábřích (MTC duplex PCR), pouze v jednom ve střevě a 4 pozitivní nálezy byly zaznamenány ve vnitřních orgánech. Proto můžeme spíše hovořit o kontaminaci z vnějšího prostředí.

U lína obecného č. 1 bylo ze žáber a střev izolováno *M. peregrinum*. Tento vyšetřovaný kus vykazuje jak znaky vnější kontaminace z prostředí (postižené jsou žábry, sval, střevo i vnitřní orgány), tak i vnitřní infekce rozšířené po celém organismu.

analýza genu *erp*

Vyšetření pomocí analýzy *erp* qPCR neprokázalo kontaminaci vzorků *M. marinum* skupinou.



Obrázek 8 – 2% agarózová elektroforéza produktů MTC duplex PCR, tilapie nilská, vzorek 26-43. Vysvětlivky: 2-18: vzorky č. 26-43; L: velikostní standard 50 bp DNA; IK: izolační kontrola; 1K: pozitivní kontrola *M. kansasii*; 2T: pozitivní kontrola *M. tuberculosis*; NK: negativní kontrola.

Tabulka 13 - Výsledky vyšetření souboru vzorků z tilapií nilských

Vzorek		Žábry		Pažerákové zuby		Játra		Střevo		Sval	
Původ	Číslo ryby	MTC duplex	erp qPCR	MTC duplex	erp qPCR	MTC duplex	erp qPCR	MTC duplex	erp qPCR	MTC duplex	erp qPCR
Tilapie nilská <i>Oreochromis niloticus</i>	1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	4	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	5	+	-	+	-	x	-	+	-	+	-
	6	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	7	+	-	x	-	x	-	x	-	+	-
	8	+	-	x	-	x	-	+	-	x	-
	9	+	-	x	-	x	-	+	-	x	-
	10	+	-	x	-	x	-	+	-	x	-
	11	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	12	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	13	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	14	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	15	+	-	+	-	x	-	+	-	+	-
	16	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	17	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-

vysvětlivky: +... pozitivní nález

-... negativní nález

x... nebylo vyšetřováno

Tabulka 14 - Výsledky vyšetření souboru vzorků z candátů obecných a línů obecných

Vzorek		Žábry		Sval		Hepatopankreas/ vnitřní orgány		Střevo	
Původ	Číslo ryby	MTC duplex	erp qPCR	MTC duplex	erp qPCR	MTC duplex	erp qPCR	MTC duplex	erp qPCR
Candát obecný <i>Sander lucioperca</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	x	-
	5	-	-	-	-	-	-	x	-
	6	-	-	-	-	-	-	x	-
	7	+	-	+	-	+	-	x	-
	8	+	-	-	-	-	-	x	-
	9	+	-	-	-	+	-	x	-
	10	+	-	-	-	-	-	x	-
	11	+	-	-	-	+	-	x	-
Lín obecný <i>Tinca tinca</i>	1*	+	-	+	-	+	-	+	-
	2	+	-	-	-	-	-	-	-

vysvětlivky: +... pozitivní nález

-... negativní nález

x... nebylo vyšetřováno

*... pozitivní nález *M. peregrinum* v žábřích a ve střevě

shrnutí

V rámci sledování výskytu NTM v rybím mase sladkovodních ryb vyskytujících se v našich sladkých povrchových vodách bylo celkem vyšetřeno 115 vzorků (žábry, pažerákové zuby, svalovina, vnitřní orgány a střeva). Byly prokázány pozitivní nálezy NTM pomocí rodově specifické detekce genu *rpoB*. Vyšetření vzorků ryb pomocí analýzy *erp* qPCR neprokázalo přítomnost MMS.

Závěrečné shrnutí získaných výsledků je uvedeno v **Tabulce 15**. V případě tilapií nilských bylo ve všech 17 vyšetřovaných kusech prokázán pozitivní nález NTM. V tomto případě můžeme hovořit o vnitřní kontaminaci zkoumaných kusů. Vyšetření candáta obecného neprokázalo infekci ani v jenom případě, u lína obecného ukázalo pouze jednu shodu ve vyšetření žáber a střev.

Zatím není potvrzeno, že právě žábry jsou místem průniku mykobakterií do rybího organismu. [66] Pravděpodobnou branou průniku mykobakterií do organismu ryby je trávicí trakt (sem patří také pažerákové zuby sloužící ke mletí potravy), odkud se infekce dále šíří do vnitřních orgánů, zejména jater, sleziny a ledvin [67]. Z vnitřních orgánů potom dochází k rozšíření infekce krevním systémem také do svaloviny, kde může docházet ke tvorbě granulomů [61].

Z výsledků plyne, že více pozitivních nálezů bylo zaznamenáno v případě ryby tilapie nilské – byly prokázány nálezy NTM jak v žábrách, tak ve střevech (u 14 kusů), což poukazuje na infekci v celém organismu. Jak již sám název napovídá, je to ryba pocházející z Afriky, kde je pěstována v teplejších vodách. Ryba preferuje teplotu vody kolem 30 °C [68], což je optimální teplota pro růst a rozmnožování rychle rostoucích NTM a *M. marinum* [2].

Ryby vyskytující se v našich sladkých vodách, zde reprezentovány candátem obecným a línem obecným, rostou v podstatně chladnějších vodách (kolem 20 °C), které nejsou pro růst mykobakterií zcela vyhovující. Výskyt *M. marinum* je tedy nepravděpodobný právě z důvodu preference chladnějších vod.

Je také nutno podotknout, že sladkovodní ryby CZE analyzované v rámci diplomové práce jsou chovány v nádržích a rybnících s nižší denzitou ryb v porovnání s akvakulturami používanými pro chov tilapií. Tato skutečnost může ovlivnit četnost infikovaných ryb a případné šíření NTM mezi jednotlivci.

Tabulka 15 - Shrnutí výsledků získaných při vyšetření MTC duplex PCR sladkovodních ryb z českých povrchových vod

Ryba	Celkem vyšetřeno [ks]	Pozitivní nález [ks]	Negativní nález [ks]	Celkem infikováno [%]
Tilapie nilská <i>Oreochromis niloticus</i>	17	17	0	100
Candát obecný <i>Sander lucioperca</i>	11	5	6	45
Lín obecný <i>Tinca tinca</i>	2	2	0	100

4.4 Sledování výskytu mykobakterií v rybím mase pocházejícím z tržní sítě

V rámci diplomové práce bylo vyšetřeno celkem 70 ryb pocházejících z tržní sítě (25 ryb ze sladkovodního chovu, sloužícího jako zdroj pro farmářské trhy, a 45 ryb ze 4 obchodních řetězců v Brně). Pro účely sledování kontaminace rybího masa NTM, jež je dostupné v tržní síti, byly vyšetřeny ryby v různé formě zpracování (mražené maso, čerstvé a chlazené na ledu nebo uzené maso). U této skupiny vzorků byla provedena detekce NTM pomocí molekulární analýzy (MTC duplex PCR, *erp* qPCR). Všechny vzorky byly také souběžně analyzovány pomocí klasických kultivačních přístupů a získané izoláty byly identifikovány pomocí sekvenční analýzy genu *16S rRNA*.

rybí maso získané z farem

Vyšetření souboru vzorků ryb chovaných v nádržích pro komerční účely – okouna říčního, candáta obecného, amura bílého, lína obecného a kapra obecného ($n = 25$ vzorků) – prokázalo kontaminaci svaloviny pouze u jedné ryby (vzorek č. 13; kapr obecný; **Tabulka 16**).

S ohledem na nízkou frekvenci výskytu NTM ve skupině sladkovodních ryb lze usuzovat, že tento záchyt je kontaminací z vnějšího prostředí, neboť vyšetřovaná tkáň nevykazovala přítomnost granulomatózních změn, které jsou zpravidla průvodním znakem u infikovaných ryb. Toto tvrzení lze podepřít skutečností, že trávicí trakt ryby nebyl pozitivní na NTM (výsledek není zahrnut do diplomové práce). Maso mohlo být kontaminováno oplachovou vodou při opracování již vyvržené ryby nebo mohlo dojít k zanesení mykobakterií skrz poraněnou kůži na těle ryby. Vyšetření specifickou *erp* qPCR neprokázalo kontaminaci rybího masa zástupci MMS.

Tabulka 16 - Výsledky vyšetření svaloviny ryb chovaných na farmách.

Vzorek		Sval	
Původ	Číslo ryby	MTC duplex	erp qPCR
Okoun říční <i>Perca fluviatilis</i>	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
Candát obecný <i>Sander lucioperca</i>	6	-	-
	7	-	-
	8	-	-
	9	-	-
	10	-	-
	11	-	-
Kapr obecný <i>Cyprinus carpio</i>	12	-	-
	13	+	-
	14	-	-
	15	-	-
	16	-	-
	17	-	-
	18	-	-
Lín obecný <i>Tinca tinca</i>	19	-	-
	20	-	-
	21	-	-
Amur bílý <i>Ctenopharyngodon idella</i>	22	-	-
	23	-	-
	24	-	-
	25	-	-

vysvětlivky: +... pozitivní nález

- ... negativní nález

x ... nebylo vyšetřováno

uzené maso

Výsledky získané vyšetřením vzorků uzeného masa ($n = 12$ vzorků) jsou shrnuty v **Tabulce 17**. použité kultivačně závislé a nezávislé metody neprokázaly přítomnost NTM v uzeném masu několika druhů ryb (pstruh duhový, tolstolobik bílý, amur bílý, kapr obecný, siven dravý a lín obecný).

Během procesu uzení masa totiž dochází ke snížení aktivity vody, a proto je povrch málo dostupný pro růst nežádoucích mikroorganismů. Samotné tepelné ošetření během uzení také přispívá k likvidaci nežádoucí mikroflóry na povrchu a uvnitř masného výrobku [69].

Tabulka 17 – Výsledky vyšetření sady vzorků uzeného masa

Vzorek		Sval		
Původ	Číslo ryby	MTC duplex	erp qPCR	Kultivace
Pstruh duhový <i>Oncorhynchus mykiss</i>	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-
Tolstolobik bílý <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	5	-	-	-
	6	-	-	-
	7	-	-	-
Amur bílý <i>Ctenopharyngodon idella</i>	8	-	-	-
Kapr obecný <i>Cyprinus carpio</i>	9	-	-	-
	10	-	-	-
Siven dravý <i>Salvelinus fontinalis</i>	11	-	-	-
Lín obecný <i>Tinca tinca</i>	12	-	-	-

čerstvé maso chlazené na ledu

Vyšetření souboru vzorků čerstvého rybího masa (chlazeno na ledu) prodávaného na pultech supermarketů prokázalo přítomnost NTM v 7 případech (**Tabulka 18**). Kultivačně nebyl v žádné rybí svalovině výskyt NTM potvrzen.

Ve vyšetřované svalovině ryb nebyla prokázána přítomnost granulomatózních útvarů, a proto lze s ohledem na nízkou frekvenci výskytu NTM ve sladkovodních rybách usuzovat, že tento záchyt je možná kontaminace z vnějšího prostředí zanesená během zpracování (např. oplachová voda). Tento dohad ovšem není možno podložit dalšími fakty, neboť nebylo možné provést analýzu trávicího traktu jednotlivých ryb. Pomocí specifické *erp* qPCR nebyla prokázána přítomnost MMS.

Tabulka 18 - Výsledky vyšetření sady vzorků čerstvého masa chlazeného na ledu

Vzorek		Sval		
Původ	Číslo ryby	MTC duplex	<i>erp</i> qPCR	Kultivace
Tolstolobik bílý <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
Amur bílý <i>Ctenopharyngodon idella</i>	4	-	-	-
Kapr obecný <i>Cyprinus carpio</i>	5	-	-	-
	6	-	-	-
	7	+	-	-
Pstruh duhový <i>Oncorhynchus mykiss</i>	8	+	-	-
	9	-	-	-
Pangas spodnooký <i>Pangasius hypophthalmus</i>	10	+	-	-
Siven dravý <i>Salvelinus fontinalis</i>	11	+	-	-

mražené maso

Výsledky vyšetření 22 vzorků mraženého rybího masa dostupného v tržní síti jsou shrnuty v **Tabulce 19**. Kultivačně nezávislou metodou byla prokázána přítomnost NTM ve 20 vzorcích. Opět nebyla pomocí *erp* qPCR prokázána přítomnost MMS. Mikrobiologickou analýzou bylo z 6 vzorků získáno 7 bakteriálních izolátů, které byly následně identifikovány na základě posouzení růstových charakteristik a dat ze sekvenční analýzy. Pouze 3 izoláty byly identifikovány jako mykobakterie (*M. neoaurum*, *M. fortuitum* a *M. immunogenum*). U jednoho vzorku byla zaznamenána směsná kontaminace (*Rhodococcus* sp. a *M. neoaurum*).

Tabulka 19 - Výsledky vyšetření sady vzorků mraženého masa

Vzorek		Sval		
Původ	Číslo ryby	MTC duplex	erp qPCR	Kultivace*
Pangas spodnooký <i>Pangasius hypophthalmus</i>	1	+	-	<i>Rhodococcus</i> sp.; <i>M. neoaurum</i>
	2	+	-	<i>Rhodococcus</i> sp; <i>Gordonia sputi</i>
	3	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
	4	-	-	-
	5	+	-	-
	6	-	-	-
	7	+	-	-
Tilapie nilská <i>Oreochromis niloticus</i>	8	+	-	-
	9	+	-	-
	10	+	-	<i>M. fortuitum</i>
	11	+	-	<i>M. immunogenum</i>
	12	+	-	-
	13	+	-	-
	14	+	-	-
Mřenka mramorovaná <i>Barbatula barbatula</i>	15	+	-	-
	16	+	-	-
Pstruh duhový <i>Oncorhynchus mykiss</i>	17	+	-	-
	18	+	-	<i>Rhodococcus</i> sp.
	19	+	-	-
	20	+	-	-
Kapr obecný <i>Cyprinus carpio</i>	21	+	-	-
	22	+	-	-

* Identifikace izolátů byla provedena na základě posouzení růstových charakteristik a sekvenční analýzy genu *16 rRNA*.

shrnutí

V rámci sledování výskytu NTM v rybím mase dostupném v tržní síti bylo celkem vyšetřeno 70 vzorků svaloviny. Na základě výsledků získaných molekulárně biologickými metodami (sledování výskytu genu *erp* a *rpoB*) a mikrobiologickými přístupy (mykobakteriální kultivace s následnou sekvenční analýzou genu *16S rRNA*) nebyl v analyzovaných vzorcích prokázán výskyt *M. marinum* ani mykobakterií jemu příbuzných. Tato skutečnost je v souladu s literárními zdroji, které uvádějí výskyt MMS v rybách pocházejících z teplejšího prostředí, než jsou povrchové vody České republiky [70].

S využitím širokospektré MTC duplex PCR byla u 28 ryb (40 %) prokázána přítomnost dalších NTM ve svalovině.

Kultivační techniky jsou částečně ovlivňovány dekontaminací vzorků. Provádí se za účelem potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů, které by mohly negativně ovlivňovat kultivaci námi sledovaných mykobakterií [34]. Pokud jsou ve vzorku přítomny mykobakterie v nízké koncentraci, může dojít k likvidaci i těchto mikroorganismů a kultivační nález je potom negativní. Použitý dekontaminační postup pravděpodobně snížil životaschopnost buněk, neboť NTM byly izolovány pouze ve 3 případech (4,3 %).

V případě ryb dovážených z asijských zemí nelze s jistotou určit, v jakých podmínkách byly chovány (čistota vody, umístění nádrží, ve kterých byly ryby chovány, kontrola krmiva z hlediska mikrobiologické nezávadnosti aj.). Chovy ryb v našich zeměpisných šířkách jsou naopak pravidelně kontrolovány, což může poukazovat na vyšší kvalitu z hlediska mikrobiologické nezávadnosti masa určeného ke konzumaci.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit kontaminaci sladkovodních ryb netuberkulózními mykobakteriemi (NTM). Pro tento účel byly použity metody molekulární biologie (širokospektrá MTC duplex PCR a specifická *erp* qPCR) a klasické kultivační přístupy (specifická mykobakteriální kultivace s následnou identifikací izolátů pomocí sekvenční analýzy genu *16S rRNA*).

V teoretické části je shrnuta problematika mykobakterií, jejich detekce a identifikace. Pojednává také o klinickém významu NTM a rizika z hlediska bezpečnosti potravin. Praktická část je zaměřena na popis jednotlivých pracovních postupů, nastavení používaných metod a vyhodnocení získaných výsledků.

NTM jsou častým patogenem v akvakulturách sloužících k chovu pro komerční účely. S ohledem na tuto skutečnost byl sledován výskyt NTM v mase amura bílého, kapra obecného, lína obecného, candáta obecného, tilapie nilské, okouna říčního, pstruha duhového, mřenky mramorované, pangase spodnookého, sivena dravého a tolstolobika bílého. Vzorky pocházely jednak z tržní sítě, kde byla pozorována kontaminace uzeného masa, čerstvého masa chlazeného na ledu, mraženého masa a masa pocházejícího z farem, kde jsou ryby pěstovány pro komerční účely, jednak z českých povrchových vod. Zpracování a případná konzumace nedostatečně tepelně opracovaného masa kontaminovaného NTM může v některých případech představovat zdravotní riziko pro člověka.

Před vlastní analýzou vzorků ryb byly optimalizovány molekulární metody použité v rámci diplomové práce. Pro posouzení použitelnosti MTC duplex PCR pro přímou detekci NTM v biologickém materiálu bylo nutné stanovit limit detekce. Za použití připraveného plazmidového standardu byla stanovena koncentrace 5×10^2 kopií genu jako limit detekce MTC duplex PCR, neboť tato hodnota byla detekována ve všech provedených opakováních. Širokospektrá konvenční PCR je zpravidla používána pro analýzu kultur a silně kontaminovaných vzorků, ale MTC duplex PCR se stanoveným limitem detekce je vhodná pro analýzu DNA izolované ze slabě kontaminovaných vzorků.

Pro posouzení skutečné míry kontaminace v analyzovaném vzorku je nutné znát účinnost izolačního postupu. Tuto hodnotu je možno stanovit za použití metod umožňujících kvantifikaci cílového organismu ve vzorku. Pomocí druhově specifické *erp* qPCR umožňující kvantifikaci *M. marinum* byl stanoven medián účinnosti izolace mykobakterií pro použitý izolační postup jako 36,5 %.

V rámci diplomové práce bylo vyšetřeno celkem 100 ryb ($n = 194$ vzorků). V první části byly analyzovány sladkovodní ryby pocházející ze dvou různých prostředí - zaprvé povrchové sladké vody České republiky, kde je celoroční průměrná teplota vody nižší a hustota žijících ryb je taktéž nízká ($n = 13$ ryb, candát a lín); zadruhé sádkový chov charakteristický vysokou hustotou ryb a stabilní teplotou vody ($n = 17$ ryb, tilapie).

V 15 případech lze hovořit o vnitřní infekci pozorovaného organismu; pozitivní nález byl prokázán jak na žábách, tak ve vnitřních orgánech ryb. Ve většině případů se však jedná o kontaminaci z vnějšího prostředí, protože mykobakterie běžně obývají vodní systémy. Ve zkoumaných vzorcích nebyla potvrzena přítomnost MMS.

Zvýšený počet infikovaných kusů byl zaznamenán v případě teplomilných ryb tilapií nilských a ryb dovezených z asijských zemí, kde je teplota vody v chovech ryb vhodná pro pomnožení a růst mykobakterií. Ryby pěstované v českých povrchových vodách byly kontaminovány v menší míře, což svědčí o jejich přirozené odolnosti k mykobakteriálním infekcím. Nejčastějším orgánem kontaminovaným NTM byly žábry. Tento orgán je vystaven vnějšímu prostředí a filtrace vody může vést ke koncentraci mykobakterií a následné kolonizaci poškozené tkáně. U jedinců s prokázaným výskytem NTM pouze v žábrách lze hovořit o kontaminaci z vnějšího prostředí, která není rozšířená na celý organismus, a z hlediska bezpečnosti potravin je lze považovat za zdravotně nezávadné.

Druhá část výzkumu byla zaměřena na sledování výskytu NTM v rybím masu ($n = 70$ ryb) dostupném na farmářských trzích a na pultech brněnských supermarketů. Byla vyšetřena svalovina ryb v různé formě zpracování (mražené maso, čerstvé a chlazené na ledu nebo uzené maso). Širokospektrální MTC duplex PCR prokázala přítomnosti NTM u 28 ryb (40 %). Druhově specifická *erp* qPCR opět vyloučila přítomnosti MMS v analyzovaných vzorcích. Jak bylo zmíněno již dříve, optimální teplota růstu *M. marinum* je 30 – 33 °C. Sladkovodní ryby v České republice mají celoročně nižší teplotu, což může být jedním z faktorů omezujícím množení a šíření této bakterie.

U vzorků ryb vyšetřených molekulárními metodami byla souběžně provedena kultivace za účelem průkazu mykobakterií. Použitý dekontaminační postup pravděpodobně snížil životaschopnost buněk, neboť NTM byly izolovány pouze ve 3 případech (4,3 %). Izoláty byly později identifikovány pomocí sekvenční analýzy genu *16S rRNA* jako *M. neoaurum*, *M. fortuitum* a *M. immunogenum*. Klasickou kultivací byl v analyzovaném souboru ryb prokázán výskyt 3 nemykobakteriálních druhů (*Rhodococcus* sp., *Gordonia sputi* a *Pseudomonas* sp.) Směsná kontaminace byla pozorována ve svalovině dvou vyšetřených ryb: pangas spodnooký č. 1 (*Rhodococcus* sp. a *M. neoaurum*) a pangas spodnooký č. 2 (*Rhodococcus* sp. a *Gordonia sputi*).

Ze získaných výsledků lze vyvodit, že ryby chované v nádržích v České republice vykazují nízkou frekvenci kontaminace NTM, pravděpodobně z důvodu vhodnějších podmínek chovu, kdy dochází k pravidelné kontrole kvality vody a krmiva z hlediska mikrobiologické nezávadnosti. V případě ryb dovážených z asijských zemí nelze zaručit, v jakých podmínkách byly ryby chovány, zde lze hovořit především o čistotě vody, umístění chovných nádrží a kontrole krmiv. Chovy ryb v našich zeměpisných šířkách proto můžeme považovat za kvalitnější z hlediska mikrobiologické nezávadnosti masa dodávaného na český trh. Nutno také podotknout, že hustota ryb chovaných v českých nádržích je obecně nižší a pokud by došlo k infekci ryb, infekce by nebyla šířena tak masově, jako tomu může být v zemích, kde je méně kvalitní kontrola chovů.

Rybí maso dostupné na českém trhu je proto možno z hlediska bezpečnosti potravin považovat za zdravotně nezávadné.

6 REFERENCE

- [1] JARZEMBOWSKI, JA a MB YOUNG. Nontuberculous Mycobacterial Infections. *ArchHIV/HIV/AIDSes of Pathology and Laboratory Medicine*. 2008; 132 (8), 1333-1341.
- [2] GRIFFITH, DE, et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007; 175 (4), 367-416. Dostupný z WWW: <<http://171.66.122.149/cgi/content/full/175/4/367#SEC10>>.
- [3] MIMS, C, et al. *Medical Microbiology*. Updated Third Edition. Spain: Elsevier Limited, 2004; 660 s. ISBN 0323035752.
- [4] *Nemoci.vitalion.cz : Vitalion. Lepší informace, lepší zdraví*. [online]. 2011 [cit. 2011-12-12]. Lepra. Dostupné z WWW: <<http://nemoci.vitalion.cz/lepra/>>.
- [5] FALKINGHAM, JO. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology*. 2009; 107, 906-910. ISSN 1364-5072.
- [6] TORTOLI, E. Clinical manifestation of nontuberculous mycobacteria infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009; 15 (10), 906-910.
- [7] NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOOD. Assessment of Food as a Source of Exposure to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). *Journal of Food Protection*. 2010; 73 (7), 1357-1397.
- [8] SLANA, I, et al. Detection methods for *Mycobacterium avium paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinary Medicine*. 2008; 53 (6), 283-306.
- [9] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2007; 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [10] *Mycobacterium tuberculosis*. BIOQUELL INC. *Bioquell* [online]. 2012 [cit. 2012-05-02]. Dostupné z: <<http://www.bioquellus.com/technology/microbiology/mycobacterium-tuberculosis/>>.
- [11] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vydání 3., opravené a doplněné. Praha: Academia, 2002; 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [12] List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: Genus *Mycobacterium*. EUZEBY, JP. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* [online]. 2012 [cit. 2012-05-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>>.

- [13] BRENNAN, PJ a H NIKAIDO. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 1995; 64, 29-63.
- [14] ADAMS, MR a MO MOSS. *Food Microbiology: Second Edition*. second edition. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2000; 262 s. ISBN 0-85404-611-9.
- [15] PARSONS, LM, et al. Rapid and Simple Approach for Identification of Mycobacterium tuberculosis complex Isolates by PCR-Based Genomic Deletion Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2002; 40 (7) [cit. 2011-11-29]. Dostupný z WWW: <tp://jcm.asm.org/content/40/7/2339.full.pdf+html>.
- [16] NOVÁKOVÁ, Z. Výskyt tuberkulózy v České republice v roce 2010. *Aktuální informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky* [online]. 2011; č. 42, [cit. 2011-12-10]. Dostupný z WWW: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/vyskyt-tuberkulozy-ceske-republice-roce-2010>.
- [17] *World Health Organisation* [online]. 2011 [cit. 2011-12-20]. Tuberculosis (TB). Dostupné z WWW: <http://www.who.int/gho/tb/en/index.html>.
- [18] *World Health Organisation* [online]. 2011 [cit. 2011-12-20]. Prevalence of leprosy. Dostupné z WWW: <http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2010.pdf>.
- [19] Tuberculosis, X-ray. *Science Photo Library* [online]. 2011 [cit. 2012-05-02]. Dostupné z: <http://www.sciencephoto.com/media/262920/view>.
- [20] PAVLÍK, I. *Učební texty a doporučené studijní materiály pro diplomanty, atestanty a postgraduální studenty* [online]. 2004 [cit. 2011-12-15]. Paratuberkulóza. Dostupné z WWW: <http://centaur.vri.cz/news/prilohy/pril518.htm>.
- [21] GREEN, EP, et al. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Research*. 1989; 17, 9063-9073.
- [22] FALKINGHAM, JO III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996; 9 (2), 177-215. Dostupný také z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172890/pdf/090177.pdf>.
- [23] MANNING, EJB. John's Disease - The International Perspective. COLLINS, MT a EJB MANNING. *ParaTB pages*. [cit. 2011-12-21]. Dostupné z WWW: <http://crohn.ie/arcHIV/HIV/AIDS/johneint.htm>.
- [24] KŘÍŽ, P, et al. Aviární mykobakterií u lidí - stále hrozící nebezpečí v České republice. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2010; 16, (1), 10-17.

- [25] THRASHER, JD a SR CRAWLEY. Mycobacterium, page 4. *Bacteria in Damp Indoor Spaces* [online]. 2011 [cit. 2012-04-21]. Dostupný z WWW: <<http://www.drthrasher.org/wpimages/wp93216a45.jpg>>.
- [26] KANTOROVÁ, K. *Detekce podmíněně patogenních mykobakterií v biologických materiálech* [online]. Brno, 2011. 58 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/th/222862/prif_m/DPKrystynaKantorova_final.pdf>.
- [27] REHULKA, J, J KAUSTOVA a E REHULKOVA. Causal agents of mycobacterial diseases in freshwater ornamental fish and their importance for human health in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*. 2006; 75 (2), 251-258.
- [28] VAN DER WERF, TS, et al. *Mycobacterium ulcerans* infection. *The Lancet* [online]. 1999; 354 (9183), [cit. 2011-12-18]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673699011563>>.
- [29] *Buruli ulcer disease : Mycobacterium ulcerans infection* [online]. 2007 [cit. 2011-12-18]. WHO, World Health Organisation. Dostupné z WWW: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs199/en/>>.
- [30] ULMANN, V. Kožní mykobakteriózy. *Zpravodaj centra klinických laboratoří zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě* [online]. 2010; 6 (2), [cit. 2011-12-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.zuova.cz/informace/cmpi/zpravodajek1201002.pdf>>.
- [31] MACEK, P, M BODNAROVA, J ZAVADA, et al.. *Mycobacterium marinum* Epididymoorchitis: Case Report and Literature Review. *Urologia Internationalis*. 2011; 87, 120-124.
- [32] RACE, EM, et al. Focal mycobacterial lymphadenitis following initiation of protease-inhibitor therapy in patients with advanced HIV/AIDS-1 disease. *The Lancet*. 1998; 351 (9098), 252-255.
- [33] DVORSKA, L, et al. Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of mycobacteria by molecular methods. *Veterinary Medicine*. 2001; 46 (11-12), 309-328. Dostupný z WWW: <<http://vri.cz/docs/vetmed/46-12-309.pdf>>.
- [34] SLANÝ, M a I PAVLÍK. Metody používané pro detekci mykobakterií u lidí - posouzení výhod a nevýhod identifikace mykobakterií pomocí sekvenční analýzy. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2012. Přehledový článek je v tisku.
- [35] YOUENS, K. Miliary tuberculosis. *Pathtalk.org: a weblog about pathology and laboratory medicine* [online]. 2007 [cit. 2012-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://pathtalk.org/wp-content/uploads/2007/10/lung-tbc-600x.jpg>>.

- [36] METCHOCK, BG, FS NOLTE a RJ WALLACE. In: Mycobacterium. In MURRAY, PR, et al. Manual of Clinical Microbiology. *American Society for Microbiology, Washington, DC.* 1999; 399-437.
- [37] WAYNE, LG a GP KUBICA. In: The mycobacteria. In: SNEATH, PHA, et al. Bergey's manual of systemic bakteriology. *The Williams&Wilkins Co.* 1996; 2, 1435-1457.
- [38] KIRSCHNER, P a EC BÖTTGER. Species identification of mycobacteria using *16S rRNA* sequencing. *Methods in Molecular Biology.* 1998; 101, 349-361.
- [39] THIERRY, D, et al. *IS6110*, an IS-like element of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Research.* 1990; 18, 188.
- [40] WILTON, S a D COUSINS. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods and Applications.* 1992; 1, 269-273.
- [41] ROTH, A, et al. Novel diagnostic algorithm for identification of the *16S-23S rRNA* gene internal transcribed spacer sequences. *Journal of Clinical Microbiology.* 2000; 38, 1094-1104.
- [42] NAGAI, R, et al. Rapid detection and identification of mycobacterial DNA by PCR. *Rinsho Byori.* 1990; 38, 1247-1253.
- [43] NIEMANN, S, et al. Genetics basis of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR fingerprint pattern in *S. meliloti* and identification of *S. meliloti* employing PCR primers derived from an ERIC-PCR fragment. *ArchIV/HIV/AIDSes of Microbiology.* 1999; 172, 22-30.
- [44] LEMAITRE, N, et al. Comparison of the Real-Time PCR method ond the Gene-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimen. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004; 4307-4309.
- [45] MOKADDAS, EM a S AHMAD. Development and Evaluation of a Multiplex PCR for Rapid Detection and Differentiation of Mycobacterium tuberculosis Complex Members from Non-Tuberculous Mycobacteria. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* 2007; 60, 140-144.
- [46] GUERRERO, C, et al. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, *IS1245*, is a specific target for analysis of strain relatedness. *Journal of Clinical Microbiology.* 1995; 33, 304-307.

- [47] SLANA, I, et al. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR. *Veterinary Microbiology*. 2010; 144, 437-448.
- [48] RITACCO, V, et al. Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* komplex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *The Internation Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 1998; 2, 242-251.
- [49] PAVLIK, I, et al. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis fo *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*. 1999; 38, 155-167.
- [50] SALATI, F, et al. A sensitive FRET probe assay for the selective detection of *Mycobacterium marinum* in fish. *Journal of Fish Diseases*. 2010; 33 (1), 47-56.
- [51] STINEAR, TP. Functional analysis and annotation of the virulence plasmid pMUM001 from *Mycobacterium ulcerans*. *Microbiology*. 1999; 151 (3), 683-692. Dostupné z WWW: <<http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.27674-0>>.
- [52] FYFE, JAM, CJ LAVENDER, PDR JOHNSON, et al. Development and Application of Two Multiplex Real-Time PCR Assays for the Detection of *Mycobacterium ulcerans* in Clinical and Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73(15), 4733-4740. Dostupné z WWW: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02971-06>
- [53] SLANA, I, P KRALIK, A KRALOVA a I PAVLIK. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 128, 250-257.
- [54] DE MENDONCA-LIMA, L, et al. The allele encoding the mycobacterial *Erp* protein affects lung dinase in mice. *Cellular Microbiology*. 2003; 5, p. 65-73.
- [55] COSMA, CL, et al. *Mycobacterium marinum Erp* is a virulence determinant required for cell wall integrity and intracelullar survival. *Infection and Immunity*. 2006; 74, 3125-3133.
- [56] SLANY, M, P JEZEK, V FISEROVA, et al. *Mycobacterium marinum* infections in humans and tracing of its possible environmental sources. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012; 58, 39-44.
- [57] TELENTI, A, et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993; 31, 175-178.

- [58] BARTOŠ, M, P ŠVÁSTOVÁ a M MORÁVKOVÁ. Stanovení přítomnosti vybraných lokusů a inzerčních sekvencí metodou PCR. 2008; *SOP č.4/02-02/A*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.
- [59] ANAND, AR, KL THERESE a HN MADHAVA. Spectrum of aetiological agent of postoperative endophthalmitis and antibiotic susceptibility of bacterial isolates. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2000; 48, 123-128.
- [60] HEIJS, SK, et al. Use of *16S rRNA* gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean cold seep. *Microbial Ecology*. 2007; 53, 384-398.
- [61] CHAMBERLIN, W, et al. Review article: *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis as a cause of Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutic*. 2001; 15, 337-346.
- [62] ELTHOLTH, MM, et al. Contamination of food products with *Mycobacterium avium* paratuberculosis: a systematic review. *Journal of Applied Microbiology*. 2009; 107, 1061-1071. Dostupný z WWW: <http://www.crohnsCanada.org/english/researchsites/Eltholth%20et%20al%202009_MAP_meat_milk.pdf>.
- [63] HARMSSEN, D, et al. RIDOM: Comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species. *BMC Infectious Diseases*. 2003; 3, 26.
- [64] Bezpečnost potravin a krmiv. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. [online]. 2010 [cit. 2012-05-03]. Dostupné z WWW: <http://www.vri.cz/cz/oddeleni/oddeleni-bezpecnost_potravin_a_krmiv>.
- [65] HOSEK, J, et al. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Veterinary Medicine*. 2006; 51 (5), 180-192.
- [66] NOVOTNY, L, et al. Morphology and distribution of granulomatous inflammation in freshwater ornamental fish infected with mycobacteria. *Journal of Fish Diseases*. 2010; 33, 947-955.
- [67] HARRIFF, MJ, LE BERMUDEZ, ML KENT. Experimental exposure of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton), to *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium peregrinum* reveals the gastrointestinal tract as the primary route of infection: a potential model for environmental mycobacterial infection. *Journal of Fish Diseases*. 2007; 30, 587-600.
- [68] Tilapie (Okounovec). *NORDSEE* [online]. 2011 [cit. 2012-05-03]. Dostupné z WWW: <<http://www.nordsee.com/cz/themen/214/Tilapie%20%28Okounovec%29>>.

- [69] KRALIK, P, HP VONDRUSKOVA, I SLANA, et al. Survival of *Mycobacterium avium* subsp *hominissuis* in Homemade Smoked Pork Sausages. *Czech Journal of Food Sciences*, 2011; 29, 647-653.

- [70] MRLIK, V, M SLANY, J KUBECKA, et al. A low prevalence of mycobacteria in freshwater fish from water reservoirs, ponds and farms. *Journal of Fish Disease*. 2012.

7 SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ

7.1 Tabulky

Tabulka 1 – Přehled metod pro detekci a identifikaci jednotlivých mykobakteriálních druhů.	20
Tabulka 2 - Podrobný rozpis vyšetřovaných vzorků	27
Tabulka 3 – Složení PCR směsi pro reakci MTC duplex	29
Tabulka 4 – Teplotní profil PCR reakce MTC duplex	29
Tabulka 5 – Složení ligační směsi	30
Tabulka 6 – Složení PCR směsi pro ověření klonů	31
Tabulka 7 – Teplotní profil PCR reakce	31
Tabulka 8 – Složení PCR směsi s pro <i>16S rRNA</i> PCR reakci	32
Tabulka 9 – Teplotní profil <i>16S rRNA</i> PCR reakce	32
Tabulka 10 - Složení směsi pro jednu <i>erp</i> qPCR reakci	34
Tabulka 11 - Teplotní profil <i>erp</i> qPCR reakce	34
Tabulka 12 - Stanovení účinnosti izolace DNA <i>M. marinum</i> z tkání pomocí <i>erp</i> qPCR	37
Tabulka 13 - Výsledky vyšetření souboru vzorků z tilapií nilských	40
Tabulka 14 - Výsledky vyšetření souboru vzorků z candátů obecných a línů obecných	41
Tabulka 15 - Shrnutí výsledků získaných při vyšetření genu <i>rpoB</i> sladkovodních ryb z českých povrchových vod	42
Tabulka 16 - Výsledky vyšetření svaloviny ryb chovaných na farmách	44
Tabulka 17 – Výsledky vyšetření sady vzorků uzeného masa	45
Tabulka 18 - Výsledky vyšetření sady vzorků čerstvého masa chlazeného na ledu	46
Tabulka 19 - Výsledky vyšetření sady vzorků mraženého masa	47

7.2 Obrázky

Obrázek 1 - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> [10].	8
Obrázek 2 - RTG snímek plic postižené TBC [18].	11
Obrázek 3 - Projevy kožní infekce způsobena <i>Mycobacteriu. marinum</i> [24].	14
Obrázek 4 - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> po barvení dle Ziehl-Neelsena [33].	18
Obrázek 5 - Reprezentativní agarózový gel znázorňující amplifikované produkty z PCR reakce MTC duplex u různých bakterií.	22
Obrázek 6 – 2% agarózová elektroforéza amplifikačního produktu <i>rpoB</i> genu o velikosti 235 bp - stanovení citlivosti detekce.	36
Obrázek 7 – 2% agarózová elektroforéza amplifikačního produktu <i>rpoB</i> genu o velikosti 136 bp - stanovení citlivosti detekce.	36
Obrázek 8 – 1,5% agarózová elektroforéza amplifikačního produktu <i>rpoB</i> genu, tilapie nilská, vzorek 26-43.	39

7.3 Grafy

Graf 1 - Trend výskytu infekcí způsobených <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB) a MAC u lidí v České republice [23].	13
Graf 2 -Kalibrační křivka získaná z lineárního ředění plazmidové DNA pro <i>erp</i> qPCR reakci.	37

8 SEZNAM ZKRATEK

<i>AIDS</i>	syndrom získaného selhání imunity
bp	páry bazí
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ε	úhlové zrychlení
<i>HIV</i>	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IAC	interní amplifikační kontrola
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>MAP</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> komplex
MMS	skupina <i>Mycobacterium marinum</i>
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> komplex
NTM	netuberkulózní mykobakterie
ot	otáčky
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	real-time PCR
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální RNA
rpm	otáčky za minutu
SO	směrodatná odchylka
TBC	tuberkulóza
UDG	Uracil-DNA Glycosylase
VÚVeL	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

zkratky států:

BEL	Belgie
CHN	Čína
CZE	Česká republika
DEU	Německo
FRA	Francie
GBR	Velká Británie
ITA	Itálie

MYS	Malajsie
NLD	Nizozemí
SVK	Slovenská republika
USA	Spojené státy americké