

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

4

VOLUME 42 (LXIX)
PRAHA
APRIL 1997
CS ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření České akademie zemědělských věd a s podporou Ministerstva zemědělství České republiky

An international journal published by the Czech Academy of Agricultural Sciences and with the promotion of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic

Editorial Board – Redakční rada

Chairman – Předseda

Prof. MVDr. Karel Hruška, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Members – Členové

Doc. MVDr. ing. Jiří Brož, CSc., Reinfelden, Switzerland

Arnost Cepica, DVM., PhD., Associate Professor (Virology/Immunology), Atlantic Veterinary College, U.P.E.I., Charlottetown, Canada

RNDr. Milan Fránek, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Ivan Herzog, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumír Hoffrek, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MUDr. Drahomír Horák, DrSc., Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. František Kovářů, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MUDr. M. V. Nermut, PhD., DSc. (h. c.), National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

Prof. MUDr. MVDr. h. c. Leopold Pospíšil, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s.,

Jilová u Prahy, Czech Republic

Prof. MVDr. Zdeněk Věžník, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

Cíl a odborná náplň: Časopis Veterinární medicína uveřejňuje původní vědecké práce a studie typu review ze všech oblastí veterinární medicíny v češtině, slovenštině a angličtině.

Časopis je citován v bibliografickém časopise Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, a abstrakty z časopisu jsou zahrnuty v těchto databázích: Agri, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 42 vychází v roce 1997.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Zdeňka Radošová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a zasílají se na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1996 je 564 Kč.

Aims and scope: The journal Veterinární medicína original publishes papers and reviews from all fields of veterinary medicine written in Czech, Slovak or English.

The journal is cited in the bibliographical journal Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, abstracts from the journal are comprised in the databases: Agri, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicity: The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 42 appearing in 1997.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: Ing. Zdeňka Radošová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1996 is 132 USD (Europe), 138 USD (overseas).

THE EFFECT OF LOW PROTEIN DIET ON THE EPITHELIUM OF NEPHRON SEGMENTS IN SHEEP

VPLYV NÍZKOBIELKOVINOVEJ DIÉTY NA EPITEL SEGMENTOV NEFRÓNU OVIEC

J. Kočišová, M. Szanyiová, Š. Faix, L. Leng

Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Changes in the epithelium thickness of proximal and distal convoluted tubule of cortex, thin descending limb of Henle loop from inner stripe of outer medulla, thick ascending limb from outer stripe of outer medulla and of collecting duct from inner medulla were investigated in young growing sheep fed a low protein diet (LP). Sheep on LP-diet were given a daily ration with 5.73 g of nitrogen and 6.13 MJ of digestible energy (DE) while the daily intake of control group was 19.51 g of N and 12.29 MJ of DE. Both groups of animals were fed these diets at least 6 weeks before collection of kidneys. Morphometric analysis with digitizing tablet showed that intake of LP-diet resulted in significant reduction of epithelium thickness in both distal convoluted tubule and thick ascending limb while the epithelium of collecting duct was found to be thicker. No changes of the epithelium dimensions were determined in proximal tubule and in thin descending limb of Henle loop. Presented results point to the morphological expression of the adaptation of sheep kidneys to a low dietary protein intake which is associated with the increased renal reabsorption of urea.

kidney; morphometry; protein intake

ABSTRAKT: Zmeny v hrúbke epitelu proximálneho a distálneho stočeného kanálíka kôry, tenkého zostupného ramena Henleho kľučky z vnútorného prúžku vonkajšej drene, hrubého vzostupného ramena vonkajšieho prúžku vonkajšej drene a zberného kanálíka vnútornej drene boli skúmané u mladých rastúcich oviec kŕmených nízkobielkovinovou diétou (LP). Kŕmna dávka oviec na LP-diéte obsahovala 5,73 g dusíka a 6,13 MJ stráviteľnej energie (DE), zatiaľčo ovce v kontrolnej skupine mali denný príjem 19,51 g N a 12,29 MJ DE. Obe skupiny zvierat prijímali tieto diéty najmenej šesť týždňov pred odobratím obličiek. Morfometrická analýza s digitizačným tabletom ukázala, že príjem LP-diéty spôsobil významnú redukciu hrúbky epitelu distálneho stočeného kanálíka a hrubého vzostupného ramena Henleho kľučky, zatiaľčo epitel zberného kanálíka bol naopak zhrubnutý. Rozmery epitelu proximálneho stočeného kanálíka a tenkého zostupného ramena sa nemenili. Prezentované výsledky ukazujú na morfológický prejav adaptácie obličiek oviec k príjmu nízkobielkovinovej diéty, ktorá je spojená so zvýšenou renálnou reabsorpciou močovinou.

oblička; morfometria; príjem bielkovín

ÚVOD

Je dobre známe, že obličky prežúvavcov na nízkobielkovinovej diéte majú veľkú schopnosť znížiť exkréciu endogénnej močovinou a vracajú ju späť do krvného obehu. Takto zadržaný dusík endogénnej močovinou je po jeho recyklizácii cez tráviaci trakt znovu využitý na proteosyntézu a stavbu tela (Boďa, 1980). Základné princípy tohto mechanizmu nazývaného renálna retencia močovinou sú redukcia glomerulárnej filtrácie a tým aj množstva prefiltrovanej močovinou (Eriksson a Valtonen, 1982), zvýšená transportná kapacita pre tubulárnu reabsorpciu močovinou (Leng a i., 1985) a zvýšená reabsorpcia močovinou cez epitel renálnej panvičky (Cirio a Boivin, 1990). Napriek množstvu informácií o tubulárnej reabsorpcii močovinou v obličkách oviec a aj iných prežúvavcov (Leng, 1991)

údaje o zmenách štruktúry obličiek oviec s vysokou tubulárnou reabsorpciou močovinou počas príjmu nízkobielkovinovej diéty (LP) v literatúre chýbajú. Preto cieľom tejto práce bolo získať nové poznatky o štruktúre tých segmentov nefrónu oviec na LP-diéte, ktoré sa najviac zapájajú do renálnej recyklizácie a reabsorpcie močovinou.

MATERIÁL A METÓDA

V pokusoch sa použili mladé rastúce ovce vo veku šesť mesiacov o živej hmotnosti 22 až 25 kg. Zvieratá v kontrolnej skupine ($n = 8$) prijímali diétu s obsahom 19,51 g N a 12,29 MJ stráviteľnej energie, ovce na nízkobielkovinovej diéte ($n = 8$) mali denný príjem 5,73 g N a 6,13 MJ stráviteľnej energie. Minerálne a voda

boli voľne dostupné. Obe skupiny boli takto kŕmené najmenej šesť týždňov pred odobratím vzoriek obličkového tkaniva. Presné zloženie diét je uvedené v tab. I. Po zabíjaní zvierat boli obličky perfundované roztokom glutaraldehydu (GA) o koncentrácii 300 $\mu\text{mol/l}$ v 0,1 molárnom fosfátovom pufrí. Excízie tkaniva boli odobrané z kôry obličiek, z vonkajšieho a vnútorného prúžku vonkajšej drene a z vnútornej drene a dofixované v GA. Potom nasledovala postfixácia v 40 $\mu\text{mol/l}$ OsO_4 , odvodňovanie v stúpajúcej alkoholovej rade, presýtenie zalievacími médiami a napokon boli excízie zaliate do Durcupanu ACM. Ultratenké rezy boli kontrastované uranylacetátom (Watson, 1958) a citrónom olovnatým (Reynolds, 1963) a následne prezreté v elektrónovom mikroskope JEM 1200 EX. Výška epitelu proximálneho a distálneho stočeného kanálika, tenkého zostupného ramena Henleho kľučky z vnútorného prúžku vonkajšej drene, hrubého vzostupného ramena vonkajšieho prúžku vonkajšej drene a zberného

kanálika vnútornej drene bola meraná pomocou digitálneho tabletu OCÉ Graphics G6451 a namerané hodnoty boli vyhodnotené nepárovým Studentovým *t*-testom.

VÝSLEDKY

Výsledky pokusov sú uvedené v Tab. II.

Epitel buniek proximálneho stočeného kanálika kontrolnej skupiny mal výšku $8,78 \pm 0,74 \mu\text{m}$, zatiaľčo u LP-skupiny sa sameralo $7,74 \pm 0,50 \mu\text{m}$ (NS).

Hrúbka epitelu distálneho stočeného kanálika bola u oviec na LP-diéte signifikantne nižšia ($5,56 \pm 0,28$ vs. $8,48 \pm 0,50 \mu\text{m}$, $P < 0,001$).

Hrúbka epitelu tenkého zostupného ramena Henleho kľučky z vnútorného prúžku vonkajšej drene bola v kontrolnej skupine $1,88 \pm 0,12 \mu\text{m}$ a u oviec na LP-diéte $1,64 \pm 0,13 \mu\text{m}$, (NS).

I. Zloženie dennej kŕmnej dávky pre ovce – Composition of daily feed ration for sheep

Kontrolná diéta ¹				
Zložka ²	Množstvo ¹⁰ (g)	Sušina ¹¹ (g)	Dusík ¹² (g)	Stráviteľná energia ¹³ (MJ)
Seno ³	350,0	297,5	6,83	2,95
Jačmeň ⁴	400,0	340,0	6,72	6,12
Pšeničné otruby ⁵	250,0	220,0	5,96	3,22
Spolu ⁶	1000,0	857,5	19,51	12,29
Nízkobielkovinová diéta ⁷				
Seno ³	100,0	85,0	1,95	0,84
Jačmenná slama ⁸	500,0	425,0	2,80	3,87
Kukuričný škrob ⁹	60,0	53,4	0,03	0,90
Pšeničné otruby ⁵	40,0	35,2	0,95	0,52
Spolu ⁶	700,0	598,6	5,73	6,13

¹control diet, ²ingredient, ³hay, ⁴barley, ⁵wheat bran, ⁶total, ⁷low-protein diet, ⁸barley straw, ⁹corn starch, ¹⁰amount, ¹¹dry matter, ¹²nitrogen, ¹³digestible energy

II. Zmeny v hrúbke epitelu (μm) segmentov nefrónu oviec kŕmených šesť týždňov nízkobielkovinovou diétou – Changes in the epithelium thickness (μm) of nephron segments of sheep fed low protein diet for six weeks

Segment nefrónu ¹	K-diéta ²	LP-diéta ³	<i>P</i>
PCT	$8,78 \pm 0,74$	$7,74 \pm 0,50$	NS
DCT	$8,48 \pm 0,50$	$5,56 \pm 0,28$	<0,001
DTL (IS OM)	$1,88 \pm 0,12$	$1,64 \pm 0,13$	NS
TAL (OS OM)	$7,05 \pm 0,38$	$5,81 \pm 0,20$	<0,05
IMCD	$6,63 \pm 0,49$	$8,35 \pm 0,50$	<0,05

Hodnoty sú priemer \pm SEM – Values are mean \pm SEM

K-diéta = kontrolná diéta – control diet

LP-diéta = nízkobielkovinová diéta – low protein diet

PCT = proximálny stočený kanálik – proximal convoluted tubule

DCT = distálny stočený kanálik – distal convoluted tubule

DTL = tenké zostupné rameno Henleho kľučky z vnútorného prúžku vonkajšej drene – thin descending limb of Henle loop from inner stripe of outer medulla

TAL = hrubé vzostupné rameno Henleho kľučky z vonkajšieho prúžku vonkajšej drene – thick ascending limb from outer stripe of outer medulla

IMCD = zberný kanálik z vnútornej drene – collecting duct from inner medulla

¹nephron segment, ²K-diet, ³LP-diet

V hrubom segmente vzostupného ramena Henleho kľučky z vonkajšieho prúžku vonkajšej drene sme zistili, že epitel zvierat na LP-diéte bol významne nižší ($5,81 \pm 0,2 \mu\text{m}$) než v kontrolnej skupine ($7,05 \pm 0,38 \mu\text{m}$, $P < 0,05$). Naproti tomu epitel zberného kanálika z vnútornej drene bol štatisticky významne vyšší u oviec na LP-diéte ($8,35 \pm 0,5$ vs. $6,63 \pm 0,49 \mu\text{m}$, $P < 0,05$).

DISKUSIA

Údaje o hlavnom mieste reabsorpcie močoviny u oviec na LP-diéte v literatúre chýbajú, čo je dané nedostupnosťou zberných kanálikov drene a papily týchto zvierat pre mikropunkčné techniky (Leng, 1991). Pokusy na potkanoch a iných hlodavcoch jasne ukázali, že hlavným miestom reabsorpcie močoviny ovplyvňujúcim jej renálnu retenciu sú zberné kanáliky vnútornej drene, resp. papily (Clapp, 1966): Zhrubnutie epitelu tohto segmentu nefrónu u oviec poukazuje na zmeny v jeho metabolickú aktivitu pravdepodobne spojenú aj so zväčšením resorpčnej plochy. Podobné výsledky boli opísané u hlodavcov na LP-diéte (Sakai a Hijikata, 1991). Isozaki a i. (1993) predpokladajú na základe podobných nálezov u potkanov, že ide vlastne o morfológický prejav zvýšeného aktívneho transportu močoviny v zberných kanálikoch. Je zaujímavé, že aj po podávaní vazopresínu potkanom boli nájdené takmer zhodné zmeny v zberných kanálikoch (Nielsen a i., 1993), čo by podporovalo názor o úlohe V2 receptorov tohto oktapeptidu pri zvýšenom transporte močoviny cez bunkové membrány (Knepper a Star, 1990).

Redukciu epitelu v tenkom zostupnom ramene Henleho kľučky u potkanov na LP-diéte popísali aj Schmidt-Nielsen a i. (1985). Je známe, že počas príjmu LP-diéty sa u oviec najvyššia tkanivová koncentrácia močoviny presúva z papily do vnútorného prúžku vonkajšej drene (Rabinowitz a i., 1973). Mohlo by to súvisieť so zásadným kvantitatívnym posunom v intrarenálnej recyklácii močoviny ako dôsledok zmenenej permeability zberných kanálikov a niektorých častí Henleho kľučky k močovine počas príjmu LP-diéty.

Na možné zapojenie aj distálneho stočeného kanálika do týchto procesov u oviec poukazujú aj početné vakuoly, dilatované endoplazmatické retikulum a autofágické vakuoly popísané v našej nedávnej práci (Kočisová, 1994).

Výsledky tejto práce sú prvými údajmi o zmenách hrúbky epitelu segmentov nefrónu prežúvavcov počas redukovaného príjmu bielkovín diétou a ukazujú na morfológický prejav adaptácie ich obličiek na zvýšenú renálnu reabsorpciu močoviny.

LITERATÚRA

- BOĎA, K. (1980): Quantifikation der Austauschprozesse des Harnstoffs zwischen dem Verdauungstrakt und Blut. Arch. Tierernähr., 30, 155–164.
- CIRIO, A. – BOIVIN, R. (1990): Urea recycling from the renal pelvis in sheep: a study with [^{14}C] urea. Amer. J. Physiol., 258, F1196–F1202.
- CLAPP, J. R. (1966): Renal tubular reabsorption of urea in normal and protein depleted rats. Amer. J. Physiol., 210, 1304–1312.
- ERIKSSON, L. – VALTONEN, M. (1982): Renal urea handling in goats fed high and low protein diets. J. Dairy Sci., 65, 385–389.
- ISOZAKI, P. – VERLANDER, J. W. – SANDS, J. M. (1993): Low protein diet alters urea transport and cell structure in rat initial inner medullary collecting duct. J. Clin. Invest., 92, 2448–2457.
- KNEPPER, M. A. – STAR, R. A. (1990): The vasopressin-regulated urea transporter in renal inner medullary duct. Amer. J. Physiol., 259, F393–F401.
- KOČISOVÁ, J. (1994): Effect of high- and low-nitrogen diets on cell ultrastructure in the cortical part of the ovine kidney. Acta Vet. Hung., 42, 121–129.
- LENG, L. (1991): Úloha obličiek a bachorovej steny v metabolizme dusíka prežúvavcov. Bratislava, VEDA.
- LENG, L. – SZANYIOVÁ, M. – BOĎA, K. (1985): The renal response of sheep to a low dietary nitrogen intake. Physiol. Bohemoslov., 34, 147–159.
- NIELSEN, S. – MULLER, J. – KNEPPER, M. A. (1993): Vasopressin- and cAMP-induced changes in ultrastructure of isolated perfused inner medullary collecting ducts. Amer. J. Physiol., 265, F225–F238.
- RABINOWITZ, L. – GUNTHER, R. A. – SHOJI, E. S. – FREEGLAND, R. A. – AVERY, E. H. (1973): Effects of high and low protein diets on sheep renal function and metabolism. Kidney Intern., 4, 188–207.
- REYNOLDS, E. S. (1963): The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17, 208–212.
- SAKAI, T. – HIJIKATA, T. (1991): Structural specialization of the basement membrane and their mechanical relevance in the kidney. In: KOIDE, H. – ENDOU, H. – KUROKAWA, K. (eds.): Cellular and molecular biology of kidney. Contr. Nephrol. (Basel, Karger), 95, 34–47.
- SCHMIDT-NIELSEN, B. – BARRETT, J. M. – GRAVES, B. – CROSSLEY, B. (1985): Physiological and morphological responses of the rat kidney to reduced dietary protein. Amer. J. Physiol., 248, F31–F42.
- WATSON, M. L. (1958): Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 475–478.

Received: 96–06–26

Accepted after corrections: 96–10–24

Kontaktná adresa:

MVDr. Lubomír Leng, DrSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4–6, 040 01 Košice, Slovenská republika; tel. 095/633 20 48, fax 095/76 21 62, e-mail: lleng@linux1.saske.sk

J'ACCUSE. ENVIRONMENT AND SMIDAK PRINCIPLES

ŽALUJI. ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ A SMIDAKOVY PRINCIPY

E. F. Smidak

Luzern, Avenirra Foundation. 1996. 143 s.

Emil F. Smidak se narodil v roce 1906 v Ostravě. Většinu svého života prožil ve Švédsku, jehož občanství také má. Pracoval v různých funkcích v průmyslu ve více evropských zemích. V současnosti je prezidentem Nadace Avenirra (Avenirra Foundation for Human Research) ve švýcarském Luzernu. V roce 1981 mu byl udělen čestný doktorát filozofie Karlovy univerzity v Praze. Jako publicista a filozof se věnuje problematice environmentalistiky, neustále vzrůstající lidské populaci, energetickým zdrojům, ohroženým živočišným a rostlinným druhům, kontaminacím vzduchu a vody, dopravě, stavu výživy, nezaměstnanosti apod.

Ne náhodou dal E. F. Smidak do názvu své knihy historicky známý nadpis obhajoby Emila Zoly v proslulé Dreyfusově aféře. Životní prostředí, s výhledem na možnost přežití budoucích generací lidstva a mnoha živočišných druhů, vzbuzuje obavy přímo alarmující. Odborníci předpovídají, že lidstvu zbývá jen několik málo desetiletí než budou vyčerpány všechny přírodní zdroje umožňující lidskou existenci a vyšší formy života. Podle IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) je na červené listině ohrožených druhů 3 175 obratlovců a 2 754 bezobratlých.

Před pěti roky se sešlo ve Washingtonu více jak 1 500 vědců (mezi nimi bylo 99 nositelů Nobelovy ceny), jimž leží na srdci budoucí osudy lidstva a života na planetě Země. Na závěr svého několikadenního rokování vydali celosvětové prohlášení k nejnáléhavějším problémům ohrožujícím život na Zemi: války, masové migrace lidské populace, bída, devastace a aridizace krajiny, znečištění oceánů toxickými látkami a mýcení deštných lesů. Vědci adresovali své poselství lidstvu. Oslovují každého člověka ať je kdekoliv, neboť v dané situaci je zapotřebí pomoci každého jedince. Svůj díl pomoci vidí E. F. Smidak v publikaci, již dal název Žaluji. Vytýčtuje dva tzv. Smidakovy principy: první princip zní Moc a Odpovědnost a druhý Akce a Reakce.

Co míní autor prvním principem? Nikdo by neměl mít víc moci než odpovědnosti a opačně. Pouze takoví

jedinci by měli vládnout mocí, kteří mohou nést i odpovědnost za své činy.

Co je míněno druhým principem? Slovo akce označuje něco, co je uděláno, vykonáno. Je to určitá míra nebo stupeň něčeho, podnikání, činnosti. Slovo reakce značí odpověď, opačný účinek, následek. Je nezbytně nutné, aby se odvíjel nepřerušovaný řetěz akcí a reakcí. Akce se dá posoudit, až objevíme největší počet možných reakcí. Nejen lidský jedinec, ale celý vesmír vznikl věčnými procesy akce a reakce probíhajícími tisíce, možná miliony let.

Jak jsou Smidakovy principy respektovány v sanačních procesech životního prostředí? Podle statistických údajů PRB (Population Reference Bureau) bylo na Zemi na začátku historické epochy (asi 7 000 let př. Kr.) sotva deset milionů lidí. V roce 1950 (tj. za 8 950 roků) vzrostla populace na 2,5 miliardy. Mezi rokem 1950 a 1987 (tj. za pouhých 37 let) se rozrostla lidská populace o stejný počet a dosáhla pěti miliard. Podle prvního principu Moci a Odpovědnosti kdo má moc ovlivnit porodnost? Kdo může učinit příslušná opatření? Kdo nese odpovědnost? Kdo a co pro problém udělal?

Ve stejné době od počátku historické epochy získávalo několik milionů lidí svou potravu z 5 000 druhů divoce rostoucích rostlin. Dnes, kdy svět obývá více než pět miliard lidí, získáváme 90 % své denní energetické potřeby z pouhých 20 rostlinných druhů.

E. F. Smidak odvodil své Principy ze života po dlouholetých profesionálních a praktických zkušenostech. Objevil fundamentální zákony, kterými se řídí dnešní cesta lidstva a života, provedl metodické analýzy nových poznatků o kombinovaných účincích přírodních procesů. Smidakovy principy jsou významné pro každý vědní obor a především pro mezioborovou spolupráci.

Pro bohatou faktografickou dokumentaci bych přečetní Smidakovy knihy doporučoval nejen každému vědeckému pracovníkovi, ale i každému člověku, neboť všichni máme svůj díl odpovědnosti za stav, který je. A na každém jedinci také záleží podaří-li se zvrátit vývoj více než znepokojující.

*Prof. MUDr. et MVDr. h.c. Leopold Pospíšil, DrSc.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno*

IDENTIFICATION OF ENTEROTOXIN-PRODUCING STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* BY PCR AND BIOLOGICAL METHODS

DETEKCE ENTEROTOXIGENNÍCH KMENŮ *ESCHERICHIA COLI* PCR A BIOLOGICKÝMI METODAMI

P. Alexa, I. Rychlík, A. Nejezchleb, J. Hamřík

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: The polymerase chain reaction (PCR) and biological methods for detection of enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* were compared. The tests for LT, STa and STb were done in the cell line Y1, suckling mice, and ligated piglet intestinal loops, respectively. The production of STb was tested only in strains negative for LT and STa. The polymerase chain reaction has proved to be a more specific and reliable method than the biological methods. Unlike the latter, PCR allows the detection of strains producing *in vitro* only low quantities of the toxin. On the other hand, PCR fails to identify strains producing toxic substances with a different structure but the same or similar biological properties.

Escherichia coli; ETEC; enterotoxins; PCR; LT; STa; STb

ABSTRAKT: V práci byla srovnávána detekce enterotoxigenních kmenů *Escherichia coli* pomocí PCR a biologickými metodami. Detekce LT byla prováděna na buněčné linii Y1, STa byl detekován na sajících myškách, STb byl prokázován u kmenů dávajících negativní výsledky při detekci LT a STa na podvázaných střevních klíčcích selat. Metoda PCR je specifitější a spolehlivější při určení schopnosti produkce enterotoxinů ve srovnání s biologickými metodami. Pomocí PCR je možno detekovat kmeny, které *in vitro* produkuje nízké množství toxinu a biologické metody je neodhalí. Pro vysokou specifitu však PCR neodhalí kmeny, které produkuje toxické substance s odlišnou strukturou, ale se stejným biologickým účinkem.

Escherichia coli; ETEC; enterotoxiny; PCR; LT; STa; STb

INTRODUCTION

Escherichia coli occurs in the digestive tract of both healthy and sick animals. Pathogenic strains differ from non-pathogenic ones particularly in that they carry virulence factors such as enterotoxins and colonization factors of diarrhoea-inducing *Escherichiae*.

The strains of *E. coli* producing enterotoxins are referred to as enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). Such strains can produce the heat-labile enterotoxin (LT), any of the heat-stable enterotoxins (STa, STb), or any combination of the three. STa and STb differ from each other in their solubility in methanol and in the biological effects. The enterotoxins produced by *Escherichiae* act on receptors of the small intestine inducing a dysbalance between intestinal absorption and secretion and the ensuing intestinal accumulation of fluid, clinically manifested as diarrhoea.

The pathogenic strains of *E. coli* can be distinguished from non-pathogenic ones by the demonstration of virulence factors. The original methods of detection of LT and ST were based on their potential to induce accumulation of the fluid in the intestine. This potential has been used in the ligated intestinal loop test (Smith and Halls, 1967). Heat-labile enterotoxin shows antigenic activity and can also be demonstrated

by serological methods. Moreover, it induces specific morphological changes in certain cell lines (Donata et al., 1974), such as Y1. Orally administered STa induces accumulation of fluid in the intestine of suckling mice, resulting in a shift of the ratio between the intestinal and body weights (Dean et al., 1972). Heat-stable enterotoxin STb is detectable by biological methods only using the ligated intestinal loop test in strains negative for LT and STa.

The developments in molecular biology enabled identification of genes coding for certain bacterial characteristics by the polymerase chain reaction (PCR). PCR is a highly specific and sensitive method allowing the identification of specific DNA segments in tested samples (Saiki et al., 1988). The aim of our experiments was to test the potential of PCR in the detection of the genes coding for LT, STa and STb in strains of *E. coli* isolated from clinical materials.

MATERIAL AND METHODS

Strains

Strains of *E. coli* maintained in the laboratory and fresh porcine and calf isolates from clinical materials were tested. The strains *E. coli* 5034 (0141 : K91 :

K88c : H10 LT + STa + STb +) and 9026 (0157 : 8813 LT + STa + STb +) were used as positive controls.

Biological methods

Biological tests were used for comparative purposes. Heat-labile enterotoxin was detected in supernatants of cultures using the cell line Y1 (Salařka et al., 1991, 1992), STa by inoculation of new-born mice (Stavřic and Jeffrey, 1976), and STb in ligated intestinal loops of piglets (Smith and Hall, 1967). The latter test was done only in strains negative for LT and STa.

PCR

The primers were selected from sequences described by Dallas and Falkow (1980), Lee et al. (1983), and Sekizaki et al. (1985) and supplied by Biovondor (Czech Republic). Heat-stable DNA polymerase (TBR Thermalase) was supplied by AMRESCO (USA).

Primers:

LT1 5' TTA CGG CGT TAC TAT CCT CT 3'
 LT2 5' GGT CTC GGT CAG ATA TGT GA 3'
 amplification product LT – 275 base pairs

STa1 5' TTT CTG TAT TAT CTT TCC CC 3'
 STa2 5' ATT ACA ACA AAG TTC ACA GC 3'
 amplification product STa – 167 base pairs

STb1 5' TCT TCT TGC ATC TAT GTT CG 3'
 STb2 5' TCT CTA ACC CCT AAA AAA CC 3'
 amplification product STb – 138 base pairs

PCR was run in 20 µl of the reaction mixture under a layer of liquid paraffin. The reaction mixture contained:

- 2 µl of the reaction buffer (tenfold concentrate)
- 200 µM NTP
- 10 pmol of each primer
- 0.5 U TBR thermalase
- 2 µl DNA (tested sample)
- and the volume was completed to 20 µl with deionized H₂O.

Stock PCR mixture for the tests of 20 samples was prepared by mixing the appropriate amounts of reaction buffer, dTPs, primers, and water to reduce the risk of contamination. The stock mixture was kept at -20 °C for up to six months. Once thawed, the rest of the mixture was never re-used. The adequate amount of TBR Thermalase was added into the thawed mixture and 18 µl volumes were distributed into 0.5 ml PCR test tubes. Finally, 2 µl of DNA (sample) were added into each tube. A positive control was run along with each set of samples.

Isolation of DNA

One colony of the tested culture was suspended in 50 µl of deionized water (MilliQ UF, Millipore) and

boiled for 10 min. Cell debris was removed by a short cycle of centrifugation (10 000 g for 1 min) and 2 µl of the supernatant were withdrawn as the DNA of the sample.

Cycling

The initial cycle of 5 min at 94 °C was followed by thirty cycles of 45 sec with alternating temperatures 92 °C, 48 °C, and 72 °C and the reaction was completed by a cycle of 5 min at 72 °C. The cycling conditions were tested using the thermocyclers MJ Research PTC 200.

The resulting amplification products were detected by electrophoresis in 2% agarose gel at 5 V/cm with ethidium bromide at the final concentration of 0.5 µg/ml. The products were visualized in a transilluminator with a UV source.

PCR and biological tests were carried out in a double blinder manner.

RESULTS

Of the 228 strains tested by PCR, 129 were tested simultaneously for the production of LT in the cell line Y1. The results are summarized in Tab. I. The two tests were yielded identical results in 125 (96.9%) strains. Negative or dubious results in the cell line test and positive results by PCR were obtained in three strains. One strain was positive by the cell line test and negative by PCR.

The production of STa was tested in 228 strains of *E. coli*. The comparison of results of the mouse test and PCR is shown in Tab. II. The production of STa was detected by both methods in 53 strains. Three strains positive by the mouse test were negative by PCR and seventeen strains, belonging to the serogroups O147 or O108, were negative (13) or dubious (4) by the mouse test and positive by PCR. Repeated mouse tests of the strains O147 and O108 yielded alternately negative, dubious and positive results.

The production of STb was examined simultaneously by the intestinal loop test and PCR in eight

I. Detection of LT in individual serogroups of *E. coli*

Serogroup	Y1 + PCR +	Y1 - PCR +	Y1 + PCR -	Y1 ± PCR +	Y1 - PCR -	Total tested
O8		1			1	2
O119			1		2	3
O139	2				1	3
O147	5				15	20
O149	18	1			2	21
O157	1				2	3
O?	3				12	15
Other	9			1	52	62
Total	38	2	1	1	87	129

II. Detection of STa in individual serogroups of *E. coli*

Serogroup	BP + PCR +	BP - PCR +	BP ± PCR +	BP + PCR -	BP ± PCR -	BP - PCR -	Total tested
O8	2			1		3	6
O9	1					12	13
O22					1		1
O54		1			1	2	4
O69		1					1
O86	1					2	3
O108	4	5	2	1			12
O119	3						3
O141	4				1	7	12
O147	4	8	2			11	25
O149	3			1	3	37	44
O152	1						1
O157	5	2	1			1	9
O?	23		1		2	30	56
Other	2					36	38
Total	53	17	6	3	8	141	228

BP - suckling mouse test

strains. The methods were in agreement (five positive and two negative) results of the two methods were obtained in seven of them. One strain (serogroup O138) was positive by the intestinal loop test, but negative for LT, STa and STb by PCR. 110 of the 228 tested strains were positive by PCR. Most of them produced simultaneously one or two of the other enterotoxins and only 10, belonging to various serogroups, produced STb alone.

Total numbers of the strains under study are given in Tab. III and differences in the detection of enterotoxins by biological tests and PCR are summarized in Tab. IV. Considering the results of repeated biological tests, identical results for LT, STa, and STb were obtained in 96.8%, 92.6%, and 87.5% of the strains, respectively.

DISCUSSION

PCR is a highly specific and accurate method for the detection of enterotoxin-producing strains of *E. coli*. A high accuracy of the detection of enterotoxigenic strains of *E. coli* by PCR was claimed by Olive (1989) and Abe et al. (1992). In our experiments, the differences in the detection of LT between the method using the cell line Y1 and PCR were found with four strains. Three of them were negative or dubious by the biological test and positive by PCR. The results of the biological test were probably due to weak enterotoxigenicity *in vitro*, while the positivity of PCR reflected the genomic structure of the strains. Positive by the biological test and negative by PCR was only one calf isolate (0.8%) classified with the serogroup O119. Apparently, this strain produced a toxin different from LT, but similar to it as far as its biological activity was concerned.

The differences between the results of the mouse test and PCR for STa were more apparent. Considerable differences were found particularly in the strains of the serogroups O108, O147, and O157 carrying the colonization factors 8813 (F18). Their enterogenicity *in vitro* was apparently low and consequently the strains yielded negative or dubious results in the mouse test. Repeated testing yielded consistently positive results in PCR, but irregular results, varying between positivity and negativity, in the mouse test. These difference confirm the superiority of PCR. Doubtful results in the mouse test in strains negative by PCR may have been due to non-specific reactions of the intestine to the administered culture filtrate. More relevant is the difference between positive mouse tests and negative PCR (Tab. II) found in 3 strains (1.3%). These strains probably produce a toxin different from porcine STa, perhaps a human-type STa or another toxin, inducing similar changes in the intestine of suckling mice.

Only eight strains were tested for the production of STb, because only strains negative by the cell line and suckling mouse tests were eligible. A difference between the results of the intestinal loop test and PCR was found only in one of them, which was positive by the biological test, but negative by PCR for STa, STb, and LT. The specificity of results of biological tests for STb depends on the correctness of the detection of LT and STa. False negative results in the suckling mouse (STa) or cell line (LT) tests result in a misinterpretation of the intestinal loop test for STb. On the other hand, the intestinal loop test is unsuitable for the demonstration of STb in strains producing also LT and/or STa, because any of the latter two alone induces the accumulation of fluid in porcine intestinal loop.

The results presented here show that PCR for LT or STa yields more accurate results than the biological

III. Numbers of tested strains of *E. coli*

	Toxin and method					
	STa		LT		STb	
	mice	PCR	Y1	PCR	loop test	PCR
Positive	56	76	41	58	6	110
Negative	158	152	87	170	2	118
Dubious	14	0	1	0	0	0
Total	228	228	129	228	8	228

IV. Comparison of results of biological tests and PCR

Detection method	% of the number tested strains		
	STa	LT	STb
PCR+ biological method +	23.2/30.7*	29.5	62.5
PCR – biological method –	61.9	67.3	25
PCR+ biological method –	7.5/1.8*	1.6	0
PCR– biological method +	1.3	0.8	12.5
PCR+ biological method ±	2.6/0.8*	0.8	0
PCR – biological method ±	3.5	0	0

* Denominator indicates the percentage of strains after repeated testing in suckling mice.

tests and it allows the detection of strains producing STb. Thus PCR is capable of replacing the detection of the toxins in suckling mice or ligated porcine intestinal loops. On the other hand, biological methods are capable of detection of other toxins with similar effects that are not detectable by the highly specific PCR. Although PCR is a suitable method for identification of enterotoxigenic strains of *E. coli*, the use of biological methods, including bioassays, will be necessary in special cases for detection of yet not defined toxic substances.

Acknowledgements

We thank Prof. Arnošt Čepiča, DVM, PhD, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, Canada, for his critical review of the manuscript.

REFERENCES

ABE, A. – OBATA, H. – MATSUHITA, S. – YAMADA, S. – KUDOH, Y. – BANGTRAKULNONTH, A. – RAT-CHTRACHENCHAT, O. A. – DANBARA, H. (1992): A sensitive method for the detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction using multiple primer pairs. *Zentbl. Bact.*, 277, 170–178.

DALLAS, W. S. – FALKOW, S. (1980): Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Nature*, 288, 499–501.

DEAN, A. G. – CHING, Y. – WILLIAMS, R. G. – HARDEN, L. B. (1972): Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice. *J. Infect. Dis.*, 125, 407–411.

DONTA, S. T. – MOON, H. W. – WHIPP, S. C. (1974): Detection of heat labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science*, 183, 334–335.

LEE, C. H. – MOSELEY, S. L. – MOON, H. W. – WHIPP, S. C. – GYLES, C. L. – SO, M. (1983): Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II. *Infect. Immun.*, 42, 264–268.

OLIVE, D. M. (1989): Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 261–265.

SAIKI, R. K. – GELFAND, D. H. – STOFFEL, S. – SHARF, S. J. – HIGUDRI, R. – HORN, G. T. – MULLIS, K. B. – ERLICH, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487–491.

SALAJKA, E. – ALEXA, P. – SALAJKOVÁ, Z. (1991): Výskyt faktorů virulence u kmenů *Escherichia coli* vyvolávajících edémovou nemoc a průjmů u selat po odstavu. *Veterinářství*, 41, 207–212.

SALAJKA, E. – SALAJKOVÁ, Z. – ALEXA, P. – HORNICH, M. (1992): Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhoea in pigs. *Vet. Microbiol.*, 32, 163–175.

SEKIZAKI, T. – AKASHI, H. – TERAKADO, N. (1985): Nucleotide sequences of the genes for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I of bovine, avian, and porcine origins. *Amer. J. Vet. Res.*, 46, 909–912.

SMITH, H. W. – HALLS, S. (1967): Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Path. Bact.*, 93, 531–543.

STAVRIC, S. – JEFFREY, D. (1976): A modified bioassay for heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin. *Can. J. Microbiol.*, 23, 331–336.

Received: 96–04–23

Accepted after corrections: 96–12–11

Contact Address:

MVDr. Pavel Alexa, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29, e-mail: kahr@vuvet.anet.cz

A METHOD OF PREVALENCE ESTIMATION OF INTRAMAMMARY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* INFECTIONS IN HERDS BY EXAMINATION OF BULK MILK SAMPLES

METODA ODHADU PREVALENCE INTRAMAMÁRNÍCH INFEKČÍ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* VE STÁDECH NA ZÁKLADĚ VYŠETŘENÍ BAZÉNOVÝCH VZORKŮ MLÉKA

P. Benda, M. Vyletělová, A. Ticháček

Research Institute for Cattle Breeding, Rapotín, Czech Republic

ABSTRACT: Parallel quantitative determination executed in 92 herds at 107 sampling dates was focused on the counts of major pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*) in bulk milk samples and on the prevalence of the above pathogens in a herd by examination of individual milk samples. The counts of main pathogens were also determined in terms of quantity in rinsing water before milking and in bulk milk samples in 5 herds with pipeline milking. Tab. I shows the qualitative analysis of the relation. Sensitivity of the method is satisfactory for the pathogens observed (95% and 91%, resp.), but method is less specific for *Staph. aureus* (67% against 92% *Str. agalactiae*). Figs. 1 and 2 show coordinate graphs of the results obtained while Figs. 3 and 4 document the distribution of frequency of the particular values in data sets. The values do not exhibit normal distribution ($P < 0.01$). Spearman's coefficient of rank correlation of bulk milk and individual examinations amounted to 0.823 and 0.900 for *Staph. aureus* and *Str. agalactiae*, respectively. Four mathematical models were tested in the course of quantitative analysis, describing the relation between bulk milk examination and individual examinations: (1) linear regression, (2) linear regression with fixed starting point, (3) logarithmic regression and (4) irrational function. A model based on the equation of irrational function (4) was found to be best: $y = a + bx + c\sqrt{x+k} \pm a_1 + i_1c_1\sqrt{x+k_1}$. Tab. II shows the parameters of the equation for examined microorganisms. Correlation coefficients for the above equation are $r = 0.733$ and $r = 0.842$ for *Staph. aureus* and *Str. agalactiae*, respectively. Prediction curves (Figs. 5 to 8) and confidence regions of prediction curves were also determined for the best model, and a prediction table was constructed (Tab. III). It was confirmed that the milking machines were not a significant source of direct contamination of bulk milk samples with the examined pathogens (Tab. V).

mastitis; bulk milk samples; quantitative determination; *Streptococcus agalactiae*; *Staphylococcus aureus*; herd prevalence; prediction

ABSTRAKT: V 92 stádech skotu a 107 odběrových termínech byl současně stanoven kvantitativně počet *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactiae* v bazénových vzorcích mléka a prevalence intramamárních infekcí uvedenými patogeny ve stáde na základě vyšetření individuálních vzorků, resp. čtvrtkových vzorků z prvních stříků mléka. Dále byl v pěti stájích s potrubním dojením stanoven kvantitativně počet hlavních patogenů v proplachových vodách před dojením a v bazénovém vzorku mléka. Metoda je pro sledované patogeny uspokojivě citlivá (95, resp. 91 %), pro *Staph. aureus* ale méně specifická (67 % oproti 92 % *Str. agalactiae*). Při kvantitativní analýze dat byly ověřeny čtyři matematické modely, popisující vztah mezi bazénovými a individuálními vyšetřeními mléka: (1) lineární regrese, (2) lineární regrese s pevným počátkem, (3) logaritmická regrese a (4) iracionální funkce. Jako nejlepší byl shledán model založený na rovnici iracionální funkce $y = a + bx + c\sqrt{x+k} \pm a_1 + i_1c_1\sqrt{x+k_1}$. Korelační koeficienty pro uvedenou rovnici činí $r = 0,733$ a $r = 0,842$ pro *Staph. aureus*, resp. *Str. agalactiae*. Pro nejlepší model byly stanoveny také predikční křivky, oblasti spolehlivosti okolo predikčních křivek a vytvořena predikční tabulka. Dále bylo potvrzeno, že transportní cesty potrubního dojícího zařízení nejsou významným zdrojem kontaminace bazénového vzorku mléka sledovanými patogeny.

mastitis; bazénové vzorky mléka; kvantitativní stanovení; *Streptococcus agalactiae*; *Staphylococcus aureus*; prevalence; predikce

Design optimálního kontrolního mastitidního programu ve stádech dojnic je v současné době neustále předmětem diskuse. Příspěvkem do spektra kontrolních bodů by mohlo být také pravidelné sledování výskytu hlavních patogenů, způsobujících intramamární infekce (IMI) (*Staph. aureus*, *Str. agalactiae*) v bazénových vzorcích mléka. Uvedené patogeny tvoří podstatnou část populace mikroorganismů, účastnících se patogenéze mastitid; například Wilson a Richards (1980) udávají 77 % ze všech izolovaných patogenů ze subklinických mastitid ve Velké Británii, Grootenhuis (1976) také 77 % a Schallibaum (1993) okolo 50 % (Švýcarsko). Uvedené práce vycházely z řádově desítek tisíc případů a poskytují tedy dostatečně reprezentativní pohled. Také naše sledování (Benda a Vyletělová, nepublikováno) na asi 25 000 vzorcích vykazují podobné výsledky; *Staph. aureus* a *Str. agalactiae* tvoří 68 % všech izolátů při vyšetření individuálních vzorků mléka. Bazénový počet somatických buněk (PSB) poskytuje sice informaci o aktuálním zdravotním stavu mléčných žláz dojnic, ovšem bez informace, co případnou poruchu funkce způsobilo. Proto také existují poněkud rozdílné názory na využitelnost bazénového PSB. Domníváme se, že znalost aktuální prevalence daných patogenů ve stádě je velmi užitečná. Korelační koeficient mezi celkovou prevalencí intramamárních infekcí ve stádě a bazénovým PSB se pohybuje podle autorů od 0,43 (Wilson a Richards, 1980) přes 0,500 (Postle aj., 1971), 0,621 (Pastrnková a Ryšánek, 1984) až po 0,879 (Pearson a Greer, 1974). Je však známo, že prevalence *Staph. aureus* a PSB korelují velmi špatně, zatímco u *Str. agalactiae* je tomu naopak (Pastrnková a Ryšánek, 1984; Postle aj., 1971). Údaje o kvantitativním stanovení hlavních patogenů v bazénových vzorcích mléka pocházejí většinou z hygienických sledování (Harvey a Gilmore, 1985; Dumoulin a Peretz, 1993), týkají se pouze *Staph. aureus* a nejsou vztaheny k prevalenci infekcí ve stádech. Kvalitativní analýzu odrazu výskytu patogenů mléčné žlázy v bazénovém vzorku mléka provedli Bramley aj., (1984), Erskine aj. (1987), Goldberg aj. (1991), Bartlett aj. (1991) a Sischo aj. (1993).

MATERIÁL A METODY

Vzorky mléka a proplachových vod

Vzorky mléka pocházely z mlékařských farem z oblasti severní a jižní Moravy a z východních Čech. Testování probíhalo v letech 1993 až 1995 v rámci poradenské činnosti k problematice mastitid. Ve 107 odběrových termínech byly v chovech současně odebrány bazénové vzorky mléka z úchovně nádrže po dojení a individuální vzorky mléka dojnic. Minimální po-

čet sledovaných dojnic ve stáji činil 23 kusů, průměrně byly v jedné stáji analyzovány vzorky od 71 dojnic. Ve stáji byly vždy vyšetřeny pokud možno všechny dojnice, včetně zvířat s klinickými příznaky a zvířat zaprahujících. Pokud v některých stájích byly provedeny opakované odběry, pak maximálně dvě opakování v intervalu větším než pět měsíců. Ve sledovaném souboru bylo zařazeno 92 stáji. Celkem bylo vyšetřeno 12 173 individuálních vzorků mléka. Bazénové vzorky mléka byly ihned po odběru zchlazeny; v případě dlouhodobějšího transportu byly konzervovány borito-sorbátovým konzervačním činidlem (Heeschen aj., 1969). Po doručení do laboratoře byly analyzovány do dvou hodin nebo pro pozdější zpracování zmrazeny a uchovávány při teplotě -18°C nejdéle po dobu 14 dní. Individuální vzorky mléka byly odebrány v souladu s doporučeními FIL/IDF (1981). V souboru se vyskytovaly jak čtvrtové, tak směsné vzorky od jednotlivých dojnic; důvodem odlišných způsobů odběru byly většínou (vzhledem k poloprovzornímu charakteru sledování) požadavky chovatelů a servisních pracovníků. Čtvrtové vzorky byly odebrány vždy ze všech čtvrtí vemene. Vzorky byly transportovány zchlazeny, stejným způsobem jako bazénové vzorky; nebyla však používána žádná konzervační činidla. Po doručení do laboratoře byly vzorky analyzovány buď ihned, nebo po uchování při teplotě 4°C nejvýše 18 hodin. V případě, kdy nebylo možno dodržet uvedené podmínky, byly vzorky zmrazeny a uchovány při teplotě -18°C nejdéle 14 dní.

Vzorky proplachových vod byly odebrány ve stájích s ověřeným vysokým výskytem sledovaných patogenů. Jednalo se o pět stáji s potrubním dojením pro 100 až 160 dojnic. Odebrán byl vždy vzorek proplachové vody před dojením a následný bazénový vzorek mléka. Pro každou stáj byl odběr zopakován třikrát.

Stanovení *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactiae*

Stanovení *Staph. aureus* v bazénových vzorcích mléka probíhalo stejným způsobem jako v naší předchozí práci (Benda a Vyletělová, 1995), stejně jako stanovení *Str. agalactiae* (Benda a Vyletělová, 1997b). Individuální vzorky mléka byly v množství asi 50 μl očkovány sterilní skleněnou tyčinkou současně na krevní agar s 8 % plně beraní krve (Columbia Blood Agar Base, HiMedia, Bombay) a Edwardsovo médium s 8 % beraní krve (HiMedia). Kultivace probíhala 18 až 24 h/37 $^{\circ}\text{C}$. Ze suspektních kolonií stafylokoků byly založeny subkultury na krevním agaru s pranými beraními erythrocyty a provedeny konfirmační testy. Jako *Staph. aureus* byly určeny kmeny s koloniemi hladkými, lesklými, s rovnými okraji, tvořící žlutý či oranžový pigment a α - či β -hemolyzin (testováno dle Skalka aj., 1979), koaguláza a clumping faktor pozitivní. Kmeny, negativní v některém z uvedených znaků, byly dále identifikovány komerčním setem STAPHY-test (Lachema, Brno) a identifi-

kačním programem TNW verze 3.1, popř. 4.0 (CCM, Brno). Suspektní kolonie *Str. agalactiae* (β -hemolytické, na Edwardsově médiu eskulin negativní) byly přeočkovány na krevní agar a dále konfirmovány. Jako *Str. agalactiae* byly určeny kmeny β -hemolytické, eskulin negativní, CAMP (β -hemolyzin *Staph. aureus*) pozitivní, s pozitivní reakcí s fenoltaleindifosfátem a hipurátové sodným. Kmeny s některými znaky negativními byly identifikovány setem STREPTO-test (Lachema, Brno) a programem TNW, popř. sérologicky (latexaglutinační test SEVA-test Strepto B).

Vyhodnocení výsledků

Pro každou sledovanou stáj a odběrový termín byly stanovené bazénové počty hlavních patogenů vztaheny k procentové frekvenci výskytu (prevalenci) příslušného organismu v souboru individuálních vzorků. Prevalence byla vztahena vždy k počtu infikovaných dojníc, a to i v případech, kdy byly analyzovány čtvrtové vzorky a pozitivní byla pouze jedna čtvrt. Hodnocení bylo provedeno jak kvalitativní, tak kvantitativní. Z kvalitativních ukazatelů byly stanoveny metodou podle McDermott aj. (1982):

$$\text{citlivost metody } Se = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$\text{specifita metody } Sp = \frac{TN}{TN + FP}$$

$$\text{schopnost pozitivní predikce } Pp = \frac{TP}{TP + FP}$$

$$\text{schopnost negativní predikce } Pn = \frac{TN}{TN + FN}$$

kde: *TP* je počet skutečně pozitivních výsledků (tj. pozitivní nález v bazénech se kvalitativně shoduje s nálezem u jednotlivých dojníc), *TN* značí počet skutečně negativních výsledků, *FP* počet falešně pozitivních výsledků a *FN* počet falešně negativních výsledků.

Při kvantitativní analýze byly stanoveny parametry jak lineárních, tak některých nelineárních regresních funkcí bazénových a individuálních stanovení:

$$\text{lineární model } y = a + bx \quad (1)$$

$$\text{lineární model s pevným počátkem } 0,0 \ y = bx \quad (2)$$

$$\text{logaritmický model (Cobb-Douglasova funkce) } y = ax^b \quad (3)$$

$$\text{nebo také } \log y = \log a + b \log x$$

$$\text{iracionální model } y = a + bx + c\sqrt{x+k} \quad (4)$$

kde: *a* jsou posunutí funkcí na ose *Y*; *b*, *c* jsou parametry lineární, resp. iracionální složky funkcí, a *k* je posunutí na ose *X*.

Byl vybrán model nejlépe popisující naměřená data; pro ten pak byly stanoveny intervaly spolehlivosti kolem křivky. Hypotéza rovnosti korelačních koeficientů testovaných modelů byla ověřena pomocí Fisherovy *Z*-transformace. Dále byla hodnocena frekvence výskytu „fatálních“ pozitivních a negativních chyb jako chyb obtížně vysvětlitelných statistickými fluktuacemi stanovení. Srovnány byly také histogramy četností výskytu patogenů jak v bazénech, tak u individuálních vyšetření.

VÝSLEDKY

Pro kvalitativní vyhodnocení jsou výsledky uvedeny v tab. I. Selektivita i schopnost pozitivní predikce přesahuje jak v případě *Staph. aureus*, tak *Str. agalactiae* hodnotu 90 %. Horší výsledky jsme obdrželi pro specifitu a negativní predikci u stafylokoků, zatímco pro streptokoky se hodnoty specifity a negativní predikce pohybují opět okolo 90 %.

Grafické znázornění souběžného individuálního i bazénového stanovení *Staph. aureus* a *Str. agalactiae* ve formě XY souřadnicového grafu uvádí obr. 1, resp. obr. 2. Vzhledem k tomu, že poměrně četné výsledky o souřadnicích 0,0 splývají, jsou připojeny ještě histogramy četností výskytu uvedených patogenů jak v ba-

I. Výsledky kvalitativního hodnocení metody – The results of qualitative evaluation of the method

Parametr ¹	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Streptococcus agalactiae</i>			
	<i>TP</i> = 97	<i>TN</i> = 10	<i>FP</i> = 5	<i>FN</i> = 5	<i>TP</i> = 63	<i>TN</i> = 44	<i>FP</i> = 4	<i>FN</i> = 6
<i>Se</i>		95,1 %				91,3 %		
<i>Sp</i>		66,7 %				91,7 %		
<i>Pp</i>		95,1 %				94,0 %		
<i>Pn</i>		66,7 %				88,0 %		

Legenda – Legend:

Se – selektivita – selectivity

Sp – specifita – specificity

Pp – schopnost pozitivní predikce – positive prediction capacity

Pn – schopnost negativní predikce – negative prediction capacity

počty – counts:

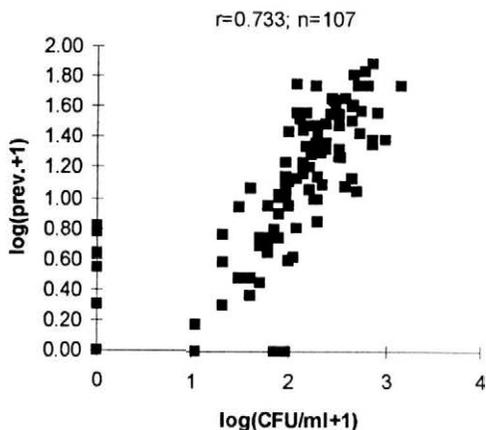
TP – skutečně pozitivních výsledků – actually positive results

TN – skutečně negativních výsledků – actually negative results

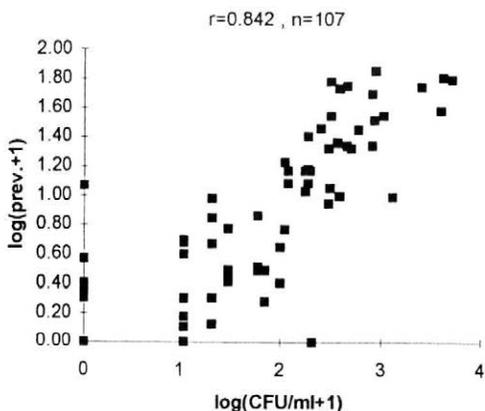
FP – falešně pozitivních výsledků – falsely positive results

FN – falešně negativních výsledků – falsely negative results

¹parameter

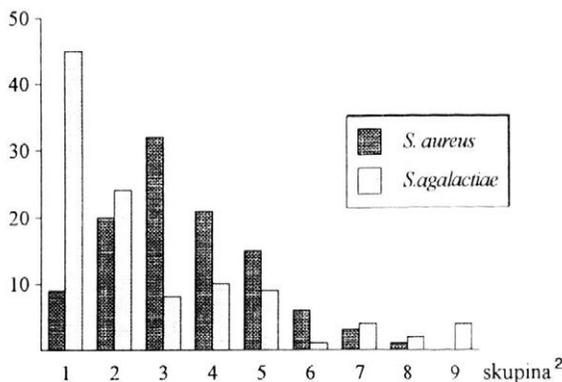


1. Souřadnicový graf vztahu stanovení *Staph. aureus* v bazénech a v individuálních vzorcích mléka – Coordinate graph of the relation showing *Staph. aureus* detection in bulk milk and in individual milk samples



2. Souřadnicový graf vztahu stanovení *Str. agalactiae* v bazénech a v individuálních vzorcích mléka – Coordinate graph of the relation showing *Str. agalactiae* detection in bulk milk and in individual milk samples

počet¹



3. Rozdělení výskytu hodnot obsahu hlavních patogenů v bazénových vzorcích mléka – Distribution of frequency of the values showing the counts of major pathogens in bulk milk samples

¹count, ²group

skupina ²	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CFU/ml	0	10-60	70-160	170-300	310-500	510-700	710-1 000	1 010-1 600	> 1 610

zěneh (obr. 3), tak v individuálních vzorcích (obr. 4). Je zřejmé, že rozdělení výskytu patogenů jak v individuálních, tak v bazénových vzorcích nemá normální charakter ($P < 0,01$) a blíží se spíše Poissonovu rozdělení, shoda s tímto typem rozdělení však nebyla prokázána. Obdobné výsledky mnohem širšího souboru bazénových vzorků u *Staph. aureus* jsme obdrželi v naší předchozí práci (Benda a Vyletělová, 1995). Vzhledem k absenci normality byl jako úvodní test proveden výpočet Spearmanova koeficientu pořadové korelace. Výsledky jsou uvedeny v tab. II a dosahují výsoce významných hodnot jak pro *Staph. aureus* ($r_S = 0,823$), tak pro *Str. agalactiae* ($r_S = 0,900$).

Pro popis závislosti frekvence výskytu patogenů v individuálních vzorcích na počtu CFU patogenů v bazénech byly detailně ověřeny čtyři modely. Výsledky ověření modelů jsou uvedeny v tab. II. Nejlep-

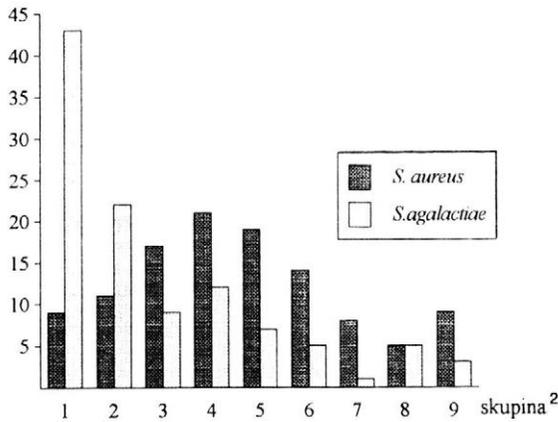
ším (hodnoceno pomocí korelačního koeficientu a sumy reziduálních čtverců) se jeví model (4), používající iracionální funkci („polozenou“ parabolu). Pro tento model byly ze získaných dat stanoveny intervaly spolehlivosti okolo křivky. Vzhledem k tomu, že rozptyl reálných hodnot okolo teoretické křivky vykazoval závislost na hodnotě x , byly odhady spolehlivosti vypočteny pro 10 intervalů na ose X a spojeny empirickou funkcí. Hranice spolehlivosti jsou pak určeny funkcemi pro kladnou odchylku

$$y_1 = y + a_1 + i_c c_1 \sqrt{x + k_1} \quad (5)$$

a analogicky pro zápornou odchylku

$$y_1 = y - a_1 - i_c c_1 \sqrt{x + k_1} \quad (6)$$

kde y je hodnota získaná ze vztahu (4), a_1 značí posunutí na ose Y , k_1 posunutí na ose X , c_1 je parametr

počet¹

4. Rozdělení výskytu hodnot prevalence hlavních patogenů ve sledovaných stádech – Distribution of frequency of the values showing the prevalence of major pathogens in examined herds

¹count, ²group

skupina	1	2	3	4	5	6	7	8	9
%	0	> 0-3	> 3-8	> 8-15	> 15-25	> 25-35	> 35-45	> 45-60	> 60

iracionální složky funkce, vymezující plochu s 90% pravděpodobností výskytu y v závislosti na x a i_t značí tabulkový index – poměr mezi tabulkovou hodnotou $u(\alpha/2)$ normálního rozdělení pro $P = 90\%$ a hodnotou $u(\alpha/2)$ požadované přesnosti. Hodnoty a_1 , c_1 , k_1 jsou pro jednotlivé mikroorganismy uvedeny v tab. II.

Výsledkem je tedy funkce predikující ve stáji frekvenci výskytu infikovaných dojnic z naměřených hodnot CFU sledovaných patogenů v bazénovém vzorku mléka:

$$y = a + bx + c\sqrt{x+k} \pm a_1 + i_t c_1 \sqrt{x+k_1} \quad (7)$$

Je použitelná v poradenských systémech, které mají integrováno pravidelné bazénové vyšetřování vzorků mléka na přítomnost hlavních patogenů. Grafické vy-

jádření uvedené funkce je pro *Staph. aureus* znázorněno na obr. 5, pro *Str. agalactiae* na obr. 7. Velmi důležitou oblast okolo počátku (0 až 100 CFU/ml) pak uvádějí obr. 6, resp. obr. 8. Pro jednoduchou orientaci pak může sloužit tab. III, která je výsledkem aplikace funkce (7). Predikční funkce byla zpětně ověřena na původních datech. Celková frekvence hodnot, ležících mimo hranici spolehlivosti 90%, pak činila 7,48% pro *Staph. aureus* a 6,54% pro *Str. agalactiae* (tab. IV).

Výsledky ověření případné kontaminace bazénového vzorku mléka sledovanými mikroorganismy křížovou kontaminací proplachových vod uvádí tab. V. Je zřejmé, že proplachové vody ani kontaminované dojíci zařízení se na zvýšení počtu patogenů v bazénovém vzorku prakticky nepodílí.

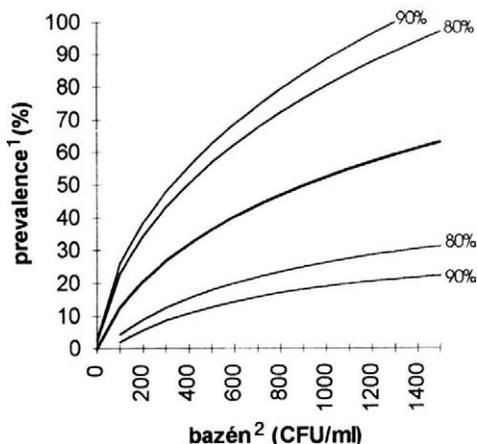
II. Výsledky ověření regresních modelů – The results of testing regression models

Parametr ¹	<i>Staphylococcus aureus</i> – funkce ²				<i>Streptococcus agalactiae</i> – funkce			
	lineární ³	lineární _{pp}	logaritmická ⁴	iracionální ⁵	lineární	lineární _{pp}	logaritmická	iracionální
a	7,809	0	0,1220	-16,53	5,5744	0	0,2329	-15,1
b	0,04971	0,0668	0,5268	-0,01503	0,0144	0,016	0,4637	-0,00997
c	-	-	-	2,6101	-	-	-	1,898
k	-	-	1	43	-	-	1	68
a_1	-	-	-	3,4	-	-	-	1,6
c_1	-	-	-	0,0194	-	-	-	0,01201
k_1	-	-	-	54,1	-	-	-	51
r	0,66644	0,5735	0,68235	0,73318	0,68144	0,6012	0,79283	0,84160
r_s	0,82333				0,90044			

Legenda – Legend:

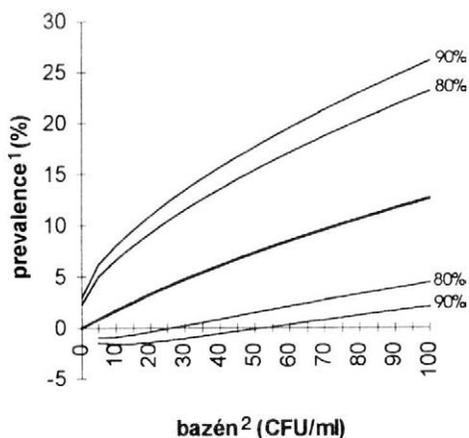
a až k_1 – parametry regresních funkcí (1) až (7) – parameters of regression functions
 r – korelační koeficient (index korelace) – correlation coefficient (correlation index)
 r_s – Spearmanův korelační koeficient – Spearman's correlation coefficient

¹parameter, ²function, ³linear, ⁴logarithmic, ⁵irrational



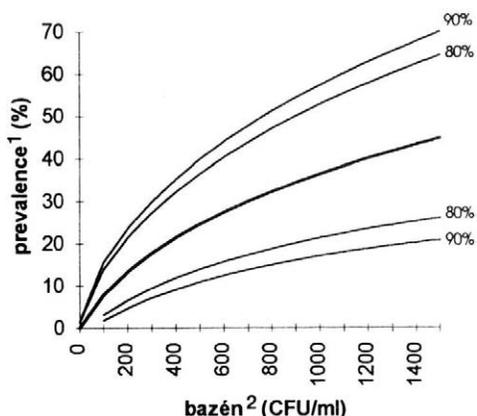
5. Predikční křivka prevalence *Staph. aureus* ve stádech s oblastmi spolehlivosti (celkový pohled) – Prediction curve of *Staph. aureus* prevalence in herds, with confidence regions (general view)

¹prevalence, ²bulk milk



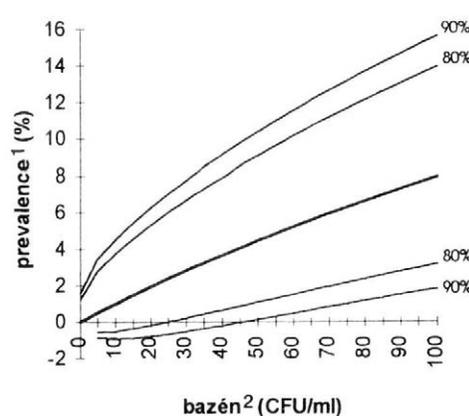
6. Predikční křivka prevalence *Staph. aureus* ve stádech s oblastmi spolehlivosti (oblast 0 až 100 CFU/ml) – Prediction curve of *Staph. aureus* prevalence in herds, with confidence regions (region 0 to 100 CFU/ml)

¹prevalence, ²bulk milk



7. Predikční křivka prevalence *Str. agalactiae* ve stádech s oblastmi spolehlivosti (celkový pohled) – Prediction curve of *Str. agalactiae* prevalence in herds, with confidence regions (general view)

¹prevalence, ²bulk milk



8. Predikční křivka prevalence *Str. agalactiae* ve stádech s oblastmi spolehlivosti (oblast 0 až 100 CFU/ml) – Prediction curve of *Str. agalactiae* prevalence in herds, with confidence regions (region 0 to 100 CFU/ml)

¹prevalence, ²bulk milk

DISKUSE

V naší práci jsme se věnovali vlivu výskytu IMI způsobených hlavními patogeny ve stádech na mikrobiologický obraz bazénového vzorku mléka. Přestože výsledky jsou poměrně uspokojivé, je nutno předeslat, že jsou zatíženy množstvím chyb, jejichž eliminace je ne-reálná, zvláště pak v podmínkách předpokládaných rutinních analýz. Bazénový vzorek nezahrnuje jednak dojnice s nestandardním mlékem, jednak zaprahlé dojnice. Dále je nutné mít na zřeteli, že počet bakterií z IMI v mléce má svou dynamiku, kdy počet mikroor-

ganismů v mléce jednotlivých dojnic se může během několika dní měnit až o několik řádů (Griffin aj., 1987). Proto se také dá předpokládat větší variabilita výsledků u menších stájí.

Nepotvrdilo se však, že dojící zařízení (ve smyslu přímého zdroje kontaminace) by mohlo mít větší vliv na výsledný obsah sledovaných patogenů v bazénu, což koresponduje i s poznatkami, že primárním zdrojem uvedených patogenů je mléčná žláza a povrch těla dojnice (Roberson aj., 1994).

III. Predikční tabulka metody; hodnota x značí obsah daného mikroorganismu v bázěnu (CFU/ml), hodnota y pak predikci prevalence ve stádě – Prediction table of the method; value x shows the content of a given microorganism in bulk milk (CFU/ml), value y prevalence prediction for a herd

Hodnota ¹ x	Staphylococcus aureus			Streptococcus agalactiae		
	odhad ² y	hranice spolehlivosti ³ (90 %)		odhad y	hranice spolehlivosti (90 %)	
0	0	0	3	0	0	1,6
10	1,7	0	8	1	0	4,5
50	7,3	0	17,7	4,6	0,1	10,4
100	12,6	2,1	26	7,9	1,8	15,7
200	20,5	5,7	38,4	13,4	4,8	23,7
300	26,7	8,5	47,8	17,8	7,2	30
500	36,2	12,7	62,6	24,6	10,9	39,9
700	43,5	15,8	74,2	30	13,8	47,8
1000	52,1	19	88,3	36,4	17,1	57,4
1500	62,9	22,3	100	44,6	20,9	69,9

¹value, ²estimate, ³confidence limit

IV. Výpis všech falešně pozitivních a negativních výsledků; jsou zvýrazněny hodnoty mimo oblast 90% spolehlivosti – A listing of all falsely positive and negative results; the values beyond the 90% confidence region are indicated by screen print

Staphylococcus aureus		Streptococcus agalactiae	
prevalence ¹ (%)	bázěň ² (CFU/ml)	prevalence (%)	bázěň (CFU/ml)
0,00	90	0,00	210
0,00	70	0,00	10
0,00	10	0,00	10
0,00	10	0,00	10
0,00	10	1,00	0
1,02	0	1,04	0
2,47	0	1,23	0
3,33	0	1,54	0
5,00	0	2,70	0
5,50	0	10,78	0

¹prevalence, ²bulk milk

Pro sledování kvalitativních ukazatelů metodiky odhadu prevalence patogenů na základě bázěňových vzorků mléka je zřejmé, že (podobně jako u kvantitativního hodnocení) výsledky získané pro *Str. agalactiae* jsou výrazně lepší. Nutno ale poznamenat, že horší výsledky specifity a schopnosti negativní predikce u stafylokoků jsou také ovlivněny malým počtem stád bez nálezu *Staph. aureus*. Malý podíl stád bez výskytu stafylokoků (6,8 %, podobně jako našich 9,3 %) uvádějí také Wilson a Richards (1980). Naše výsledky jsou však pozitivně ovlivněny systémem výběru, neboť stáda sledovaná v rámci poradenství patří většinou k problémovým. V objektivním zhodnocení celé oblasti (Benda a Vyletěllová, 1995) jsme u 30 % vzorků našli pro *Staph. aureus* méně než 10 CFU/ml v bázěnu. Podobné výsledky uvádějí také Bartlett aj. (1991), kdy *Staph. aureus* detekovali v 69 % bázě-

V. Analýzy souvisejících vzorků proplachových vod a mléka; hodnoty jsou aritmetickými průměry opakovaných měření – Analyses of related samples of rinsing water and milk; the values are arithmetic means of repeated measurements

Stáj	Staphylococcus aureus (CFU/ml)		Streptococcus agalactiae (CFU/ml)	
	proplachová voda ¹	mléko ²	proplachová voda	mléko
1	3	367	0	0
2	0	281	0	0
3	10	530	0	0
4	0	80	0	389
5	0	172	0	573

¹rinsing water, ²milk

nových vzorků mléka, zatímco Erskine aj. (1987) a Sicho aj. (1993) udávají 44, resp. 45 %. Podstatně se však liší naše výsledky kvantitativních ukazatelů od údajů jiných autorů. Citlivost detekce *Str. agalactiae* ve stádě na základě bázěňového vzorku na rozdíl od 91 % v našem sledování (tab. I) udávají Postle aj. (1968) 84 % a Godkin a Leslie (1990) dokonce pouhých 20 %. Také citlivost metody pro *Staph. aureus* (v našem sledování 95 %) uvádějí Bartlett aj. (1991) 41 % a Godkin a Leslie (1990) jen 6 %. Postle aj. (1968) stanovili minimální detekovatelnou stájovou prevalenci *Str. agalactiae* v bázěňovém vzorku na 5 %, zatímco naše výsledky stanovují hodnotu okolo 2 %. Podle našeho názoru spočívá podstata problému v metodice stanovení. Například pro *Str. agalactiae* je nutné použití selektivního média s využitím hemolytických interakcí (Skalka a Smola, 1979a; Benda a Vyletěllová, 1997b). Na Edwardsově médiu či TK/FC médiu (Sicho aj., 1993) jsou ojedinelé kolonie *Str. agalactiae* velmi snadno přehlédnutelné, zvláště při vyšší kontaminaci enterokoky. Z obr. 4 je zřejmé, že asi 30 % vzorků pozitivních pro *Str. aga-*

lactiae obsahuje do 100 CFU/ml a 22 % vzorků do 60 CFU/ml, což je pouhých šest kolonií. Také pro stanovení *Staph. aureus* je nutné použití selektivních půd. Při použití Baird-Parker média lze očekávat zvýšení záchytnosti ještě zhruba o 20 až 30 % (Benda a Vyletěllová, 1997a).

V našem sledování funkce, popisující průběh závislosti prevalence *Staph. aureus* a *Str. agalactiae* ve stáji na koncentraci sledovaných patogenů v bazénovém vzorku mléka, neměly lineární charakter (pro zjednodušení, vzhledem k předpokládanému užití, uvádíme závislost prevalence na bazénech, ačkoli jsme si vědomi, že příčinný vztah je pochopitelně opačný). Z tab. II je zřejmé, že lineární model (1) není příliš vhodný. Nepříjemné je zvláště značné posunutí na ose Y, zanášející do odhadu y zbytečnou chybou. Pokud pro korekci posunutí použijeme model s pevně zvoleným počátkem (2), dochází ke značnému snížení korelace. Mnohem lepší výsledky dávají nelineární modely, přičemž statisticky nejsou odlišné ($P > 0,1$) Cobb-Douglasova funkce (3) a model, používající iracionální křivku (4). Přesto jsme zvolili model (4), neboť v obou případech dával nejlepší výsledky. Za pozornost stojí fakt, že oba sledované mikroorganismy vykazovaly přibližně stejný tvar predikční křivky; pouze u *Str. agalactiae* jsou parametry b a c (tab. II) menší, tedy křivka je plošší. To by svědčilo o vyšší koncentraci *Str. agalactiae* v mléce infikovaných dojníc než v případě stafylokoků. Pro nelinearitu závislosti však uspokojivou hypotézu nejsme schopni navrhnout; model (4) však mnohem lépe (v obou případech $P < 0,01$) než lineární modely popisuje naměřené údaje.

Ze získaných křivek (obr. 5 až 8) je tedy možné odhadovat prevalenci hlavních patogenů ve sledovaném stádě. Je také možno odhadovat pravděpodobnost chyb; z obr. 6, resp. 8 lze jako průsečíky křivek o 90% spolehlivosti s osami vymezit jednak oblast rizika falešně pozitivních výsledků (do 50 CFU/ml) a dále oblast snížené citlivosti (rizika falešně negativních výsledků) do 3 % u stafylokoků a do 2 % u streptokoků. V tab. IV jsou uvedeny všechny případy zmiňovaných chyb. Zvýrazněné jsou chyby, ležící již mimo hranice spolehlivosti metody. Zvláště u *Str. agalactiae* bychom však hraniční hodnoty chyb přičítali spíše pochybení v laboratoři než selhání metodiky.

ZÁVĚR

V naší práci používáme kvantitativní analýzu hlavních patogenů v bazénových vzorcích mléka jako doplňkovou informaci při sledování zdravotního stavu stád již delší dobu. Vytvoření exaktních predikčních rovnic (při vědomí všech nevýhnutelných zkresení) nyní zpřesňuje tuto metodu; pravidelným sledováním jednotlivých stáji jsme pak schopni eliminovat většinu zmíněných zdrojů chyb. Vedle obrazu celkového zdravotního stavu mléčných žláz, který podává bazénový PSB, tak získává poradenský servis další významné in-

formace pouze na základě bazénového vzorku, a tedy velmi jednoduchým a levným způsobem.

LITERATURA

- ANDĚL, J. (1985): Matematická statistika. Praha, SNTL/ALFA.
- BARTLETT, P. C. – MILLER, G. Y. – LANCE, S. E. et al. (1991): Use of bulk tank and milk filter cultures in screening for *Streptococcus agalactiae* and coagulase-positive staphylococci. J. Fd Protect., 54, 848–851.
- BENDA, P. – VYLETĚLOVÁ, M. (1995): Výskyt *Staphylococcus aureus* v bazénových vzorcích mléka. Veter. Med. – Czech, 40, 221–226.
- BENDA, P. – VYLETĚLOVÁ, M. (1997a): Testování kulti-vačních médií pro stanovení *Staphylococcus aureus* v bazénových vzorcích mléka. Vet. Med. – Czech, 42, 1–17.
- BENDA, P. – VYLETĚLOVÁ, M. (1997b): Ověření vlastnosti TKT média pro screening *Streptococcus agalactiae*. Vet. Med. – Czech, 42, 71–80.
- BRAMLEY, A. J. – MCKINNON, C. H. – STAKER, R. T. – SIMPKIN, D. L. (1984): The effect of udder infection on the bacterial flora of the bulk milk of ten dairy herds. J. Appl. Bact., 57, 317–323.
- DUMOULIN, E. – PERETZ, G. (1993): Qualité bactériologique du lait cru de chevre en France. Lait, 73, 475–483.
- ERSKINE, R. J. – EBERHART, R. J. – HUTCHINSON, I. J. et al. (1987): Herd management and prevalence of mastitis in dairy herds with high and low somatic cell count. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 190, 1411–1421.
- FIL/IDF (1981): Document 132, 17–18.
- GODKIN, M. A. – LESLIE, K. E. (1990): The relationship between bulk tank milk culture, management factors used in mastitis control and the herd prevalence mastitis. In: Proc. Int. Symp. Bovine Mastitis, pp. 368–374.
- GOLDBERG, J. J. – PANKEY, J. W. – DRECHSLER, P. A. et al. (1991): An update survey of bulk tank milk quality in Vermont. J. Fd Protect., 54, 549–553.
- GRIFFIN, T. K. – MORANT, S. V. – DODD, F. H. (1987): Diagnosing infectious subclinical mastitis in surveys of large scale experiments. The analysis and interpretation of the results of an international trial organised by the IDF mastitis expert group (A2). Bull. IDF, 211, 9–24.
- GROOTENHUIS, G.: A randomized mastitis investigation in the Netherlands (1973/74/75). [Report.] Central Veterinary Institute, Rotterdam.
- HARVEY, J. – GILMOUR, A. (1985): Application of current methods for isolation of staphylococci in raw bovine milk. J. Appl. Bact., 59, 207–221.
- HEESCHEN, W. – REICHMUTH, J. – TOLLE, A. – ZIEDLER, H. (1969): Preservation of milk samples for bacteriologic and cytologic examinations and examinations for inhibitors. Milchwissenschaft, 24, 729–734.
- MCDERMOTT, M. P. – ERB, H. N. – NATZKE, R. P. (1982): Predictability by somatic cell count related to prevalence of intramammary infection within herds. J. Dairy Sci., 65, 1535–1539.
- PASTRNKOVÁ, M. – RYŠÁNEK, D. (1984): Závislost počtu somatických buněk v bazénových vzorcích na prevalenci

- kontagiózních mastitid ve velkých stádech. Vet. Med. (Praha), 29, 577–581.
- PEARSON, J. K. L. – GREER, D. O. (1974): Relationship between somatic cell count and bacterial infection of the udder. Vet. Rec., 95, 252–257.
- POSTLE, D. S. (1968): Evaluation of a selective medium for screening bulk milk samples for *Streptococcus agalactiae*. Amer. J. Vet. Res., 29, 669–678.
- POSTLE, D. S. – NATZKE, R. P. – EVERETT, R. W. (1971): Relationship between leucocyte counts in bulk milk and apparent quarter infection in dairy herds. J. Milk. Ed. Technol., 34, 517–520.
- ROBERSON, J. R. – FOX, L. K. – HANCOCK, D. D. – GAY, J. M. (1994): Ecology of *Staphylococcus aureus* from various sites on dairy farms. J. Dairy Sci., 77, 3354–3364.
- SCHALLIBAUM, M. (1993): Mastitis pathogens in Switzerland. Antimicrob. Agents and Chemother., 34, p. 20.
- SISCHO, W. M. – HEIDER, L. E. – MILLER, G. Y. – MOORE, D. A. (1993): Prevalence of contagious pathogens of bovine mastitis and use of mastitis control practice. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 202, 595–600.
- SKALKKA, B. – SMOLA, J. (1979): Návrh diagnostického média pro *Streptococcus agalactiae*. Veterinářství, 29, 412–413.
- SKALKKA, B. – SMOLA, J. – PILLICH, J. (1979): Simple method of detecting staphylococcal hemolysins. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A, 245, 283–286.
- WARD, G. E. – POSTLE, D. S. – BERMAN, D. T. (1970): Evaluation and proposed applications of a one-step method for isolation and identification of *Streptococcus agalactiae*. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 156, 224–229.
- WILSON, C. D. – RICHARDS, M. S. (1980): A survey of mastitis in the British dairy herds. Vet. Rec., 106, 431–435.

Received: 96–03–19

Accepted after corrections: 96–10–23

Kontakní adresa:

RNDr. Pavel B e n d a, Výzkumný ústav pro chov skotu, 788 13 Rapotín, Česká republika
Tel. 0649/21 41 01, fax 0649/21 57 02

BIOCHEMISTRY

BIOCHEMIE

Donald et Judith G. Voet

John Wiley and Sons, Inc., 1990. 2nd ed. 1 361 s.

Předkládaná učebnice biochemie je souborem poznatků z biochemie a je členěna do pěti základních částí. Představuje ucelený soubor poznatků z biochemie a molekulární biologie. Jednotlivé kapitoly jsou doplněny novými poznatky, které byly publikovány v uplynulých pěti letech. Kniha je doplněna řadou barevných tabulí, fotografií, elektronmikroskopických snímků, schémat chemických vzorců a metabolických drah.

První část je věnována úvodním a základním informacím. Jsou zde uvedeny základní životní funkce prokaryotických a eukaryotických buněk. Je také vzpomenu na vznik života a fylogenezi organismů. Voda je nezbytnou součástí živých systémů, a tak je jí věnována celá samostatná kapitola. Některé fyzikální zákonitosti popisuje třetí kapitola.

Druhá část knihy se zabývá biomolekulami. První kapitola této části je nazvána aminokyseliny. Je uveden výčet jejich fyzikálních a chemických vlastností, včetně kovaletních struktur a standardních aminokyselin v proteinech. Navazující problematikou je technika purifikace proteinů, kovaletní struktura proteinů, trojrozměrná struktura proteinů, vyšší struktury proteinů a jejich strukturální vývoj. V samostatné kapitole jsou popsány funkce hemoglobulinu, včetně jeho patologických mutací. Další kapitola se věnuje sacharidům a polysacharidům. Popisuje jednotlivé monosacharidy a tvorbu vzorců. Pozornost je věnována fyziologickým a biochemickým vlastnostem polysacharidů (kyselina hyaluronová, chondroitin sulfát, glukosaminy).

Lipidy a membrány představují další samostatnou kapitolu. Po seznámení s klasifikací a názvoslovím se čtenář dozví o vlastnostech lipidů. Následuje popis jejich vazby s proteiny a sacharidy ve fluidním modelu membrán. Není opomenuta vazba lipidů na bílkovinné nosiče, jejich metabolismus a vliv na aterosklerózu.

Třetí část je věnována mechanismům enzymových reakcí. Po úvodu do enzymologie jsou prezentovány výpočty v enzymových reakcích a enzymové katalýze.

Čtvrtá část je věnována metabolismu. Vstupem do této problematiky je úvod do metabolických procesů. Prvním popsáným jevem je glykolýza a metabolismus glykogenu. Transport látek přes membrány je popsán v další kapitole. Následuje cyklus kyseliny citronové, elektronový transport a oxidativní fosforylace, fotosyntéza, metabolismus aminokyselin, nukleových kyselin a metabolismus tuků. V metabolismu sacharidů jsou uvedeny také ostatní alternativní dráhy. V další kapitole je energetický metabolismus popisován ve vztahu k jednotlivým orgánům (mozek, sval, tuková tkáň, játra) a k metabolickým adaptacím (hladovění, *Diabetes mellitus*).

Pátá část je věnována expresi a přenosu genetické informace. V úvodu jsou uvedeny základní poznatky z mendelovské genetiky, genetiky bakterií a virů. Další kapitola popisuje stavbu a strukturu nukleových kyselin a základní metody molekulární biologie, včetně restrikční analýzy, sekvencování, molekulárního klonování, genomových knihoven, PCR a genomových terapií.

Klasické jsou popisy transkripce, translace, DNA replikace, reparace a rekombinace. Zajímavou kapitolu představují viry. Autoři se věnovali některým představitelům těchto organismů (virus mozaiky tabáku, některým sférickým virům, bakteriofág λ , viru chřipky, viroidům, prionům). Následuje eukaryotická exprese. Významnou kapitolou je molekulární fyziologie. Je zde popsán mechanismus srážení krve, imunitní systém, pohybové systémy (svaly, cilie, flagely), hormony a neurotransmitery.

Na konci každé kapitoly je uveden souhrn základních poznatků a seznam použité literatury. Samozřejmě jsou kontrolní otázky.

Knihu je možné doporučit všem, kteří se zabývají biochemií, molekulární biologii a fyziologií. Je však potřebné připomenout, že tato kniha je výrazně levnější, než její český překlad z roku 1995. Učebnice se dá zakoupit asi za 1 160 Kč.

*René Kizek**Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno*

MOLECULAR GENETICS METHODS IN IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF BACTERIAL STRAINS AND SPECIES*

VYUŽITÍ METOD MOLEKULÁRNÍ GENETIKY PŘI IDENTIFIKACI A DIFERENCIACI BAKTERIÁLNÍCH DRUHŮ A KMENŮ

I. Rychlík, I. Pavlík

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: The aim of the paper is to inform on methods and practical application of DNA fingerprinting in typing of living organisms. Methods discussed in the review include standard DNA fingerprinting, plasmid profile analysis, RAPD PCR and direct sequencing of selected parts of genomes. In each method molecular basis together with its advantages and limitations is explained. All described methods are supplemented with selected cases of their practical application.

DNA fingerprinting; restriction endonuclease; probe; genome; plasmid profile; RAPD PCR; direct sequencing

ABSTRAKT: V posledních několika letech jsme svědky velkého zájmu o diferenciaci a typizaci bakterií metodami molekulární biologie. Cílem předkládané práce je proto seznámit odbornou veřejnost s metodami a využitím DNA typizací při diferenciaci živých organismů. Do přehledu byly vybrány metody standardního DNA fingerprintingu, analýzy plazmidových profilů, RAPD PCR a přímého sekvenování vybraných částí genomu. U každé metody je stručně vysvětlen princip a naznačeny možnosti použití s poukazem na její výhody a nevýhody. Jednotlivé metody jsou vždy doplněny o konkrétní příklady využití.

DNA fingerprinting; restrikční endonukleáza; sonda; genóm; plazmidový profil; RAPD PCR; přímé sekvenování

Seznam použitých zkratk: DNA – deoxyribonukleová kyselina; RNA – ribonukleová kyselina; rRNA – ribozomální RNA; RAPD PCR – random amplified polymorphic DNA PCR; PCR – polymerase chain reaction; polymerázová řetězcová reakce; REA – restrikčně endonukleázová analýza; PAGE – polyacrylamid gel electrophoresis; bp – base pair, pár bazí; kb – 1 kb = 1000 bp, kilobáze; IS – insertion sequence, inzerční sekvence.

CONTENTS

1. Introduction
2. Methods used in DNA typing
 - 2.1. DNA fingerprinting
 - 2.1.1. Direct comparison of genome structures
 - 2.1.2. Restriction endonuclease analysis of genome (REA)
 - 2.1.3. DNA fingerprinting
 - 2.1.3.1. Quality of DNA
 - 2.1.3.2. Restriction endonucleases
 - 2.1.3.3. Probes
 - 2.1.3.4. Practical application of DNA fingerprinting
 - 2.2. Plasmid profile analysis
 - 2.2.1. Protocols used in plasmid profile analysis
 - 2.2.2. Limits of plasmid profile analysis
 - 2.2.3. Practical applications of plasmid profile analysis

* Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 508/94/0830 and No. 514/95/1594).

- 2.3. Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD PCR)
 - 2.3.1. Molecular basis of RAPD PCR
 - 2.3.2. Advantages and disadvantages of RAPD PCR
 - 2.3.3. Practical applications of RAPD PCR
- 2.4. Direct sequencing of selected parts of genomes
 - 2.4.1. Practical applications of direct sequencing
3. Conclusions
4. References

OBSAH

1. Úvod
2. Metody používané při analýze DNA
 - 2.1. DNA fingerprinting
 - 2.1.1. Přímé porovnávání struktury genomu
 - 2.1.2. Restrikční analýza genomu (REA)
 - 2.1.3. Vlastní DNA fingerprinting
 - 2.1.3.1. Kvalita DNA
 - 2.1.3.2. Restrikční endonukleázy
 - 2.1.3.3. Sondy
 - 2.1.3.4. Příklady praktického využití DNA fingerprintingu
 - 2.2. Analýza plazmidových profilů
 - 2.2.1. Používané postupy při analýze plazmidových profilů
 - 2.2.2. Limitující faktory analýzy plazmidových profilů
 - 2.2.3. Příklady praktického využití analýzy plazmidových profilů
 - 2.3. Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD PCR)
 - 2.3.1. Princip metody RAPD PCR
 - 2.3.2. Výhody a nevýhody metody RAPD PCR
 - 2.3.3. Příklady praktického využití RAPD PCR
 - 2.4. Přímé sekvenování
 - 2.4.1. Příklady praktického využití přímého sekvenování
3. Závěr
4. Literatura

ÚVOD

Od počátku 70. let v souvislosti s objevem enzymů atakujících a modifikujících nukleové kyseliny došlo k nebyvalému rozmachu molekulární biologie. Důsledky tohoto poznání dnes ovlivňují způsob práce prakticky ve všech oborech zabývajících se studiem živých organismů. Jednou z aplikací je využití poznatků molekulární biologie při diferenciaci a typizaci živých organismů. Předností těchto postupů je porovnání organismů na základě genetické informace a nikoli prostřednictvím fenotypového projevu, na kterém jsou založeny téměř všechny doposud využívané metody sérotypizace, fagotypizace, rezistence k antibiotikům a další (Kuhn aj., 1991; Katouli aj., 1992a, b, 1993; Stubbs aj., 1994; Wegener aj., 1994).

Uplatnění typizace a diferenciacie metodami molekulární biologie je velmi široké. V současné době jsou využívány v epidemiologii, při studiu evoluce živých organismů, v humánní genetice při řešení paternitních sporů atd. (Nishimi, 1992; McCabe, 1992). Značná pozornost je rovněž věnována využití analýz DNA jako stěžejních důkazů v soudních sporech (Decorte a Cassiman, 1993). V odborné literatuře je možno najít mnoho přehledných prací o využití ana-

lyzy DNA při typizaci organismů (Eppelen, 1992; Brdička a Nurnberg, 1993). Cílem naší práce pak není opakování známých skutečností, ale rádi bychom nespécializovanému českému čtenáři poskytli základní informace o využití a metodických postupech zaměřených, vzhledem k našim zkušenostem, zejména na diferenciaci bakterií.

2. METODY POUŽÍVANÉ PŘI ANALÝZE DNA

Při charakterizaci živých organismů analýzou jejich DNA je možno vyčlenit čtyři hlavní, metodicky odlišné směry:

- standardní DNA fingerprinting založený na štěpení DNA restrikčními endonukleázami (REA) a hybridizací s vhodně zvolenou sondou
- analýza plazmidových profilů
- RAPD PCR (Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction)
- přímé sekvenování vybraných úseků genomu živých organismů

V tab. I je uvedena vhodnost použití jednotlivých metod u prokaryot (organismy bez jádra – zejména bakterie), eukaryot (prvoci a všechny vyšší organismy) a u virů.

Použitá metoda ¹	Procaryota	Eucaryota	Viry ⁶
REA – restrikční endonukleázová analýza ²	+	–	+
Standardní DNA fingerprinting ³	+	+	–
Analýza plazmidových profilů ⁴	+	–	–
RAPD PCR	+	+	–
Přímé sekvenování ⁵	+	+/-	+

Vysvětlivky – Explanatory notes:

+ vhodné – convenient

+/- omezeně využitelné – limited application

– nevhodné nebo se nepoužívá – inconvenient or not used

¹technique, ²restriction endonuclease analysis, ³standard DNA fingerprinting, ⁴plasmid profile analysis, ⁵direct sequencing, ⁶viruses

2.1. DNA fingerprinting

Podobně jako pomocí otisků prstů můžeme identifikovat jedince lidské populace, je možné najít rozdíly mezi živými organismy i na úrovni nukleových kyselin. Proto je tohoto pojmu přeneseně užíváno při identifikaci libovolných živých organismů analýzou jejich DNA.

Pojem DNA fingerprinting je různými autory používán v různých souvislostech. V naší práci se přikláníme spíše k jeho širšímu významu, kdy je možné metody DNA fingerprintingu rozdělit do tří skupin.

Klíčovými enzymy používanými při metodách DNA fingerprintingu jsou restrikční endonukleázy (Nathans and Smith, 1975). Tyto enzymy jsou schopny štěpit DNA jen na místech o určité sekvenci. Délka této cílové (recognition) sekvence se nejčastěji pohybuje od 4 do 8 bp. Například *Hae* III štěpí DNA pouze v místě o sekvenci 5' CCGG 3', *Eco* RI rozpoznává a štěpí sekvenci 5' GAATTC 3' a *Not* I štěpí uvnitř sekvence 5' GCGGCCGC 3'. Je zřejmé, že čím delší je cílová sekvence, tím méně častěji se tato sekvence na DNA vyskytne. Tím větší jsou vzdálenosti mezi jednotlivými sekvencemi a tím větší jsou i výsledné velikosti jednotlivých DNA fragmentů vzniklých po štěpení.

2.1.1. Přímé porovnání struktury genomu

Přímé porovnání struktury genomu je možné použít jen u některých skupin mikroorganismů, jejichž genom je složen z několika různě velkých fragmentů nukleových kyselin. Jsou jimi např. rotaviry, které obsahují 12 segmentů dvouřetězcové RNA o odlišné velikosti, mykoplazmata s různě velkými chromozómy, nebo kvasinky se 3 až 12 chromozómy. Tyto chromozomy, resp. fragmenty DNA, je možné od sebe elektroforeticky oddělit a následně po obarvení detekovat rozdílnou délku fragmentů nukleových kyselin (Yarovoy aj., 1991).

2.1.2. Restrikční analýza genomu (REA)

REA je využívána u virů a bakterií. Princip spočívá v naštěpení DNA porovnávaných organismů restrikční-

mi endonukleázami, elektroforetické separaci a přímé vizualizaci a analýze vzniklých restrikčních fragmentů.

Jednotlivé restrikční endonukleázy jsou charakteristické délkou své cílové sekvence, která se pohybuje od 4 bp do 8 bp. Při metodě REA je tedy možné použít kombinaci různých typů restrikčních endonukleáz dle délky jejich cílové sekvence (4 bp, 6 bp nebo 8 bp) s různým uspořádáním elektroforetické separace. V tab. II je uvedena vhodnost kombinace obou prvků při studiu bakteriálního genomu.

II. Kombinace různých typů restrikčních endonukleáz a typů elektroforezy u bakterií při metodě REA – Combinations of various types of restrictive endonucleases and types of electrophoresis in bacteria using REA technique

Typ elektroforezy ¹	Typ restrikční endonukleázy ⁵		
	4 bp	6 bp	8 bp
V polyakrylamidovém gelu (PAGE) ²	+/-	+	–
V 0.8% agarózovém gelu ³	+	+/-	+/-
Pulsní elektroforeza ⁴	–	+	+

Vysvětlivky – Explanatory notes:

+ vhodné – convenient

+/- omezeně využitelné – limited application

– nevhodné nebo se nepoužívá – inconvenient or not used

* vhodné k separaci velkých fragmentů nukleových kyselin

(50 kb až 2 Mb) – suitable to separation of large fragments of nucleic acids (50 kb to 2 Mb)

¹type of electrophoresis, ²in polyacrylamide gel (PAGE), ³in 0.8% agarose gel, ⁴pulse field electrophoresis, ⁵type of restriction endonuclease

A. Využití restrikčních endonukleáz s cílovou sekvencí 4 bp

Restrikční endonukleázy s cílovou sekvencí 4 bp se používají zejména v kombinaci se standardní elektroforezou v agarózovém gelu. Přestože bývá neodlišena velká část fragmentů o nízké molekulové hmotnosti, je možné pomocí omezeného počtu kvalitně rozdělených fragmentů v oblasti vyšších molekulových hmotností (5 kb až 15 kb) snadno srovnat jednotlivé organismy (Wilson aj., 1992).

B. Využití restrikčních endonukleáz s cílovou sekvencí 6 bp

Štěpení restrikčními endonukleázami s cílovou sekvencí dlouhou 6 bp bývá nejčastěji kombinováno s elektroforézou ve standardním agarózovém gelu. Přestože jsou výsledky poměrně obtížně hodnotitelné, je této aplikace využíváno při epidemiologickém průzkumu (Helmuth von aj., 1990; Rychlík aj., 1993). Například Ramos a Harlander (1990) úspěšně porovnali kmeny *Lactococcus* sp. a *Streptococcus* sp. při kvasných procesech v mlékárenském průmyslu. Metodou REA rozlišili jednotlivé produkční kmeny a stanovili jejich vzájemný poměr před a po kvasném procesu. Tím bylo možné kontrolovat, případně odhadovat nejvhodnější poměr produkčních kmenů k optimálnímu průběhu kvašení. Mencarelli aj. (1993) metodou REA detekovali při sérii vyšetření tři různé DNA typy kmenů sérotypu B druhu *Haemophilus influenzae*.

Při srovnání výše uvedeného postupu (restrikční endonukleázy s cílovou sekvencí 6 bp a standardní elektroforéza) a postupu s pulsní elektroforézou byly dosaženy srovnatelné výsledky jak z hlediska rozlišovací schopnosti, tak i z hlediska rozložení jednotlivých skupin kmenů podle různých DNA typů (Haertl a Bandlow, 1993).

Pro snadnější hodnocení složitých DNA profilů Bjorvatn aj. (1994) využili 6 bp restrikčních endonukleáz s následnou elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Vzhledem k tomu, že do polyakrylamidového gelu mohou vputovat jen relativně nečtené fragmenty o nízké molekulové hmotnosti (do 1 kb), je výsledné spektrum REA relativně dobře čitelné (Tveten aj., 1991; Dasi aj., 1992).

C. Využití restrikčních endonukleáz s cílovou sekvencí 8 bp – makrorestrikční analýza

Využití restrikčních endonukleáz s cílovou sekvencí dlouhou 8 bp (např. *Not I*, *Sfi I* nebo *Pac I*) bylo umožněno zdokonalením pulsní elektroforézy, která dokonale rozdělí fragmenty o vysoké molekulové hmotnosti. V některých případech, pokud genom studovaného organismu štěpí jen na velmi malém počtu míst („rare cutters“), je možné použít i restrikční endonukleázy s 6bp cílovou sekvencí (např. *Xba I*, *Bam HI* nebo *Dra I*). Prevost aj. (1992) uvádějí, že makrorestrikční analýza má dokonce vyšší rozlišovací schopnost než ribotypizace u druhu *Staphylococcus* sp.

Přestože je makrorestrikční analýza využitelná pouze při studiu genomu bakterií, nabývá v poslední době na značném rozmachu, zejména díky možnosti vnechání hybridizace (Corich aj., 1991; Bohm a Karch, 1992; Bautch, 1993; Powell aj., 1994; Suzuki aj., 1995; Pantůček aj., 1996). Významná je i možnost snímání elektroforetických gelů s omezeným počtem fragmentů pomocí CCD kamery nebo scanneru, jejich počítačové zpracování a archivace.

Publikovány byly práce bezprostředního využití při průkazu původu infekce při epidemiích v nemocnicích (Ichijama aj., 1991; Ott aj., 1991) nebo při širších epidemiologických studiích (Lévy-Frebaull aj., 1989; Yan aj., 1991). Pulsní elektroforézy a „rare cutters“ restrikčních endonukleáz je také využíváno při mapování prokaryotického genomu (Amjad aj., 1990; Le Bourgeois aj., 1992; Liu a Sanderson, 1992).

2.1.3 Vlastní DNA fingerprinting

Vlastní DNA fingerprinting je založen na izolaci dostatečného množství DNA, štěpení restrikčními endonukleázami a hybridizaci s vhodnou sondou. Výsledek je ovlivňován kvalitou izolované DNA, výběrem restrikčních endonukleáz a použitou sondou.

2.1.3.1. Kvalita DNA

Kvalita DNA je kritickým parametrem, který limituje možnosti využití tohoto vyšetření. Pro spolehlivé výsledky je nutno získat nejméně 3 µg vysoce molekulární DNA.

2.1.3.2. Restrikční endonukleázy

Výběr restrikčních endonukleáz do značné míry záleží na volbě každého autora. Obecně se však preferují restrikční endonukleázy s 4 bp cílovou sekvencí, i když v konkrétních případech mohou být využity i restrikční endonukleázy s cílovými sekvencemi o délce 6 bp. Restrikční endonukleázy s delší cílovou sekvencí je vhodné používat zejména v případech, kdy určitá restrikční endonukleáza byla ověřena nezávisle několika autory a užívá se jako „standard“. Pokud tento obecný konsensus neexistuje, jsou využívány restrikční endonukleázy štěpící DNA studovaného organismu na co největší počet restrikčních fragmentů. Uvedenou podmínku splňují nejčastěji restrikční endonukleázy se 4 bp dlouhou cílovou sekvencí (např. *Hinf I*, *Hae III*, *Alu I*, *Sau 3A*, *Msp I* nebo *Taq I*). V některých případech je doporučováno použití restrikčních endonukleáz u nichž je obsah GC bázi jejich cílové sekvence podobný obsahu GC bázi v DNA studovaného organismu.

2.1.3.3. Sondy

Vhodných a využívaných sond pro DNA fingerprinting je celá řada. Některé z nich mají širší využití, jiné je možné využít jen pro omezený počet druhů. Hlavní kritérium pro výběr sondy je optimální počet kopií určitého úseku DNA reagujícího se sondou v genomu studovaného mikroorganismu (nejlépe 5 až 15 kopií). Před použitím musí být DNA sonda radioaktivně nebo neradioaktivně naznačena (Schildkraut, aj., 1961; Wetmur, 1976, 1991). V současnosti se ustupuje od radioaktivního značení nukleových kyselin, které se nahrazuje neradioaktivním. Při neradioaktivním značení

se do molekuly nukleové kyseliny inkorporuje haptěm značený nukleotid (nejčastěji biotin, digoxigenin nebo fluorescein). Hapten je pak prokazován enzymaticky následnou kolorimetrickou nebo světelnou reakcí. V některých případech je na DNA sondu přímo navázána peroxidáza, která je pak standardními postupy detekována.

Obecně je možné rozdělit sondy používané k DNA fingerprintingu na dva typy:

A. Sondy polynukleotidové (rekombinantní)

Polynukleotidové sondy jsou připravovány izolací a naklonováním určitého úseku DNA do vhodného vektoru (Jeffreys aj., 1985a, b, c; Wetmur, 1991; Pavlík aj., 1994, 1995). Do této skupiny je možné přidat sondy polynukleotidové připravené *in vitro* amplifikací nukleových kyselin pomocí PCR (Pelkonen aj., 1994; Pavlík aj., 1996). Sondy připravené pomocí PCR jsou přesně definovány svými primery a mohou být standardně používány libovolnými laboratorfemi po celém světě. Po purifikaci mohou být neradioaktivně značeny a využity v hybridizaci. Tento systém se plně osvědčuje při DNA fingerprintingu *Mycobacterium paratuberculosis*, kdy je sonda IS900 připravena PCR, přečištěna a neradioaktivně označena pomocí peroxidázy. Příprava sondy včetně PCR trvá necelé čtyři hodiny (Pavlík aj., 1996).

Polynukleotidové sondy je možné dále volně rozdělit do tří skupin:

a) Ribotypizace

V genetice prokaryot se určitým standardem stalo využití sond komplementárních ke genům pro rRNA, tzv. ribotypizace (Martinetti a Altwegg, 1990; Pedersen aj., 1994; Gruner aj., 1994). U prokaryot se geny pro rRNA vyskytují v závislosti na druhu mikroorganismu v počtu do patnácti kopií na genom. Vysoká homologie v těchto genech i mezi vzdáleně příbuznými bakteriálními druhy a rody umožňuje použití jedné sondy u širokého spektra bakteriálních druhů (Peillon aj., 1994). Těto skutečnosti je využíváno i při studiu fylogeneze (Nastasi aj., 1991; De Muro aj., 1992; Izard aj., 1992; Scieux aj., 1992; Stanley aj., 1992c; Olsen aj., 1994a).

b) Polynukleotidové sondy virového původu

DNA některých virů obsahuje sekvence použitelné jako sondy (Crawford aj., 1991). Nejznámější a nejčastěji využívanou sondou tohoto typu je 15bp sekvence využívající se ve dvou kopiích v genomu fága M13 (Weihe aj., 1990; Barysheva aj., 1991; Tassanakajon aj., 1991). Přestože jsou tyto virové sekvence nejčastěji používány při DNA fingerprintingu u eukaryot (Gatei aj., 1991), mohou být použity i v genetice prokaryot (Abadijeva aj., 1992; Mitěva aj., 1992).

c) Polynukleotidové sondy – IS sekvence

Ze sond využitelných jen u omezeného množství bakteriálních druhů lze jmenovat fragment IS900 využitelný při fingerprintingu *Mycobacterium paratuberculosis* (Pavlík aj., 1995) nebo fragment IS200 používaný u *Salmonella* sp. (Gibert aj., 1990; Liebisch a Schwarz, 1996). Využitím fragmentu IS200 u salmonel se zabývá celá řada autorů a jednotlivé sérovary (Gibert aj., 1990; Stanley aj., 1992b, c; Pelkonen aj., 1994) byly testovány IS200 fingerprintingem a srovnány s výsledky ribotypizace (Chowdry aj., 1993; Ezquerro aj., 1993; Stanley aj., 1994).

U ostatních druhů mikroorganismů byly testovány i jiné přísně druhově specifické sondy. Jsou využívány jak při studiu epidemiologie a epizootologie, tak při průkazu původce. Jejich specifita totiž umožňuje detekci druhově specifické DNA ve vzorcích biologického materiálu. Například Nath aj. (1992) se specifickou sondou pro *Gardnerella vaginalis* poukázali na heterogenitu populace i u jednotlivých infikovaných pacientek. Stanley aj. (1992a, d) typizovali terénní kmeny *Helicobacter pylori* se specifickou sondou. V čeledi *Enterobacteriaceae* je možné pro DNA fingerprinting využít i některé repetitivní sekvence (Hulton aj., 1991; Woods aj., 1993) nebo inzerční elementy (Sharples a Lloyd, 1990; Ramirez-Santos aj., 1992).

B. Sondy oligonukleotidové (synteticky připravené)

Sekvence oligonukleotidových sond jsou odvozeny od sond rekombinantních (Rychlík a Bejčková, 1994). Na základě repetitivních sekvencí s jednoduchým motivem, např. (GT)_n nebo (GTG)_n, je možné uměle nasynetizovat krátké oligonukleotidy a ty pak použít jako sondy. Jejich délka se nejčastěji pohybuje mezi 15 až 20 bazemi, např. (GTG)₅ nebo (GT)₈. Po hybridizaci je lze snadno odstranit promytím a jedna membrána může být opakovaně rehybridizována s několika oligonukleotidovými sondami po sobě. Jsou použitelné u všech druhů organismů, od bakterií (Doll aj., 1993; Rychlík a Bejčková, 1994; Rychlík aj., 1994a), přes plísňe (Meyer aj., 1991), kvasinky (Sullivan aj., 1993), rostliny (Tzuri aj., 1991; Vosman aj., 1992), ptáky (Lubjuhn aj., 1993; Rychlík aj., 1994b) až po člověka (Zischler aj., 1989).

2.1.3.4. Příklady praktického využití DNA fingerprintingu

Největší pozornost poutá využití DNA fingerprintingu v humánní genetice. V lékařství se tato technika používá při kontrole úspěšnosti transplantací (Kunstmann aj., 1992), při řešení příbuzenských vztahů (Jeffreys aj., 1985a), paternitních sporů (McCabe, 1992) nebo v kriminalistice při objasňování tres-

tných činů (Gill aj., 1985). Jako zdroj DNA ve všech těchto případech je možno využít jakékoli tkáň včetně vlasů, slin, krve nebo spermatu (McCabe, 1992). Výhodou těchto stanovení je stabilita DNA ve zmraženém nebo vyschlém materiálu. Určitým standardem v humánní genetice jsou sondy 33.15 a 33.6 (Jeffreys aj., 1985b, c), přičemž v poslední době se začínají využívat i syntetické oligonukleotidové sondy (Zischler aj., 1989).

V genetice prokaryot je u ribotypizace popisována větší rozlišovací schopnost než u standardních typizačních metod, zejména fagotypizace. Například u rodu *Staphylococcus* bývá fagotypizace neúčinná u velkého množství klinicky významných kmenů (Preheim aj., 1991; Blumberg aj., 1992; Pignatarì aj., 1992). Adler-Mosca aj. (1991) prokázali pomocí ribotypizace vznik spontánní rezistence ke kyselině nalidixové, ciprofloxacinu a norfloxacinu v průběhu léčby pacientů infikovanými kmeny *Campylobacter jejuni* a *C. coli*. Rezistentní a senzitivní kmeny byly totiž shodného ribotypu. De Muro aj. (1992) potvrdili ribotypizační stávající systém rozdělení druhu *Bacillus sphaericus*, přičemž od sebe odlišili kmeny pro hmyz patogenní a nepatogenní.

V laboratorii pro diagnostiku paratuberkulózy ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně je DNA fingerprinting s restričními endonukleázami *Pst* I a *Bst* EII využíváno k diferenciaci kmenů *Mycobacterium paratuberculosis*. V České republice jsou systematicky vyšetřovány kmeny *M. paratuberculosis* izolované od roku 1988 (Pavlík aj., 1994, 1995, 1996). Při studiu molekulární epizootologie byla vyšetřena DNA 336 kmenů *M. paratuberculosis* izolovaných od zvířat a pacientů s Crohnovou chorobou z 12 států tří kontinentů. Po štěpení s restriční endonukleázou *Pst* I bylo zjištěno devět a po štěpení s restriční endonukleázou *Bst* EII 14 reprezentativních DNA typů, přičemž při paralelní kombinaci obou těchto enzymů bylo zjištěno 18 DNA typů (Pavlík aj., 1996).

2.2. Analýza plazmidových profilů

Velké množství bakterií obsahuje ve svých buňkách mimo chromozomální DNA i další nezávisle se replikující molekuly DNA – plazmidy. Například více než 90 % terénních kmenů druhů *Salmonella* sp. nebo *Escherichia coli* obsahují určitý plazmid.

Plazmidy bakterií mohou být značně rozdílné velikosti (od 1 kb až do 200 kb) a mohou se vyskytovat v buňce v jedné nebo i v několika stech kopiích. Na základě těchto rozdílů je možné porovnávat jednotlivé bakteriální kmeny.

2.2.1. Používané postupy při analýze plazmidových profilů

Používané postupy přednostně degradují chromozomální DNA a RNA a ve vyšetřovaném vzorku převa-

žuje plazmidová DNA. Izolované plazmidy jsou potom rozděleny elektroforeticky v agarózovém gelu podle své molekulové hmotnosti s možností vzájemného porovnávání získaného spektra plazmidů (Birnbom a Doly, 1979; Kado a Liu, 1981).

2.2.2. Limitující faktory analýzy plazmidových profilů

Zásadním limitujícím faktorem analýzy plazmidových profilů je obtížné srovnávání jednotlivých typů plazmidových profilů získaných v různých časových odstupech mezi sebou. Ani zavedení vhodných standardů tuto nevýhodu zcela neodstraní. Proto na základě našich zkušeností doporučujeme ve sporných případech srovnávat plazmidové profily jen u paralelně vyšetřovaných kmenů na jednom elektroforetickém gelu. Další možností je štěpení izolovaných plazmidů vhodnou restriční endonukleázou.

Dalším limitujícím faktorem je i určitá nestabilita plazmidů u bakteriální buňce zejména při časté subkultivaci nebo dlouhodobém skladování bakteriálních kmenů (Hartstein aj., 1991; Sinha, 1992; Olsen aj., 1994b; Hartstein aj., 1995). Analýzu plazmidových profilů není možné provést u kmenů, které plazmidy vůbec neobsahují (Pignatarì aj., 1992).

2.2.3. Příklady praktického využití analýzy plazmidových profilů

Analýza plazmidových profilů se díky své uspokojivé vypovídající schopnosti, rychlosti a nízké finanční náročnosti široce uplatňuje při detailnější charakterizaci bakterií. Zaškolený laboratorní pracovník může analyzovat až 50 bakteriálních kmenů během jednoho pracovního dne. Analýza plazmidových profilů se v některých laboratořích používá jako samostatný screeningový postup (Franklin aj., 1990; Azad aj., 1992; Olsen aj., 1992b; Marranzano aj., 1995). Častěji je však analýza plazmidových profilů součástí ostatních typizačních metod (Nastasi aj., 1988; Fantasia aj., 1991; Pohl aj., 1991; Laguerre aj., 1992; Olsen aj., 1992a; Rychlík aj., 1993; Usera aj., 1993; Brown aj., 1994; Millemann aj., 1995). U *Salmonella* sp. se obvykle doporučuje fagotypizace následně doplněná analýzou plazmidových profilů (Ferris aj., 1992; Martini aj., 1992; Rychlík aj., 1995). Ferris aj. (1992) přitom pozorovali určitou korelaci mezi plazmidovým typem a citlivostí či rezistencí k antibiotikům.

Pomocí analýzy plazmidových profilů byla studována epidemiologie infekcí způsobených kmeny *Mycobacterium avium*. Jucker a Falkinham (1990) zjistili, že plazmidy izolované z kmenů *M. avium* od pacientů s AIDS byly podobné s plazmidy izolovanými z kmenů *M. avium* z vnějšího prostředí. Přitom se tyto plazmidy zcela lišily od plazmidů izolovaných z kmenů *M. avium* od zvířat. K podobným výsledkům dospěli i Masaki aj. (1989).

2.3. Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD PCR)

S rozvojem PCR (Saiki aj., 1985, 1986, 1988) se vyvinula i modifikace této metody vhodná pro identifikaci a diferenciaci živých organismů nazývaná RAPD PCR (Caetano-Anolles aj., 1991a; Mazurier a Wernars, 1992; Meunier a Grimont, 1993). V odborné literatuře se rovněž používají synonyma DAF – DNA Amplification Fingerprinting (Caetano-Anolles aj., 1991b; Caetano-Anolles a Bassam, 1993), nebo AP PCR – Arbitrarily Primed PCR (Welsh aj., 1991, 1992a) nebo PCR fingerprinting (Graser aj., 1993).

2.3.1. Princip metody RAPD PCR

Princip metody spočívá v opakované syntéze různých velkých amplifikačních produktů. Na rozdíl od standardního uspořádání PCR se však nevyužívají dva specifické primery, ale pouze jeden kratší nespecifický primer (Caetano-Anolles aj., 1991a). Při vlastní amplifikaci se používají nízké teploty pro párování primerů se studovanou DNA (Caetano-Anolles aj., 1992; Meunier a Grimont, 1993). Doporučuje se pouze, aby obsah bazí G a C v připraveném primeru odpovídal obsahu GC párů ve studované DNA a aby sekvence primeru splňovala obvyklá kritéria PCR primerů (např. aby neobsahovala takové sekvence, které by umožňovaly tvorbu dimerů primerů). Obvyklá velikost primerů se pohybuje kolem 10 bp, vzhledem k vlastnostem *Taq* polymerázy však musí být větší než 5 bp (Caetano-Anolles aj., 1991a, 1992).

Primery se náhodně váží k místům s komplementárními sekvencemi. Jestliže k této vazbě dojde v dostatečně krátké vzdálenosti, zmnoží se tento úsek po mnohonásobně cyklické reakci. Pokud k podobným událostem dojde náhodně na různých místech studované DNA, výsledné produkty o různé molekulové hmotnosti je možno elektroforeticky rozdělit a vizualizovat v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Jejich vzájemným porovnáním lze získat informace o totožnosti či odlišnosti studovaných organismů.

2.3.2. Výhody a nevýhody metody RAPD PCR

Výhodou RAPD PCR jsou její minimální nároky na množství DNA potřebné pro analýzu a do určité míry i minimální nároky na její kvalitu. Velmi často je pro izolaci DNA dostačující krátké povaření suspenze buněk. Po centrifugaci je do reakce odebrána malá část supernatantu, která však obsahuje dostatečné množství dostatečně čisté DNA (Akopyanz aj., 1992; Meunier aj., 1992; Brousseau aj., 1993). Další předností RAPD PCR je rychlost a absolutní nezávislost na předchozí znalosti porovnávaných organismů (Bassam aj., 1992).

Nevýhody naopak spočívají v nesnadné optimalizaci. Z toho vyplývají problémy při porovnávání výsled-

ků mezi jednotlivými laboratořemi a dokonce i mezi výsledky dosaženými různými pracovníky téže laboratoře. Snaze po odstranění tohoto nedostatku odpovídá velká pozornost, věnovaná optimalizaci této metody (Caetano-Anolles aj., 1992; Graser aj., 1993; Meunier a Grimont, 1993; Micheli aj., 1994).

2.3.3. Příklady praktického využití RAPD PCR

Praktické použití zatím nedosáhlo vzhledem k nárokům na optimalizaci takového uplatnění, jako je tomu v případě metody standardního DNA fingerprintingu (Belkum van, 1994). RAPD PCR se používá většinou jen na vzájemné srovnávání jednotlivých bakteriálních kmenů a na porovnávání rozlišovací schopností RAPD PCR s ostatními DNA typizačními metodami. Ze speciálně zaměřených studií (Alos aj., 1993; Struelens aj., 1993; Millemann aj., 1996) vyplývá značná korelace mezi výsledky dosažovanými pomocí RAPD PCR a ostatními DNA typizačními metodami.

Použitím RAPD PCR se například podařilo rozčlenit 22 studovaných kmenů *Streptococcus uberis* do 15 skupin, zatímco restrikcí analýzou bylo získáno jen 12 rozdílných skupin (Jayarao aj., 1992). Welsh aj. (1992b) při studiu původce lyméské boreliózy *Borrelia burgdorferi* rozčlenili pomocí RAPD PCR tento druh do tří fylogenetických skupin. Zástupci I. skupiny byli identifikováni v Severní Americe a v Euroasii, zatímco zástupci II. a III. skupiny byli izolováni pouze v Euroasii. Cancilla aj. (1992) dosáhli uspokojivých výsledků u kmenů *Lactococcus lactis*. Příbuzné kmeny měly téměř identický PCR fingerprinting, zatímco kmeny vzdáleně příbuzné měly PCR fingerprinting značně odlišný. Podobných výsledků dosáhli Harrison aj. (1992) při typizaci kmenů *Rhizobium* sp. a řadili metodu RAPD PCR jako velmi perspektivní a slibnou pro stanovení genetické příbuznosti jednotlivých terénních kmenů. Brousseau aj. (1993) dosáhli zajímavých výsledků při RAPD PCR typizaci u *Bacillus thuringiensis*.

V humání genetice bylo metody RAPD PCR použito při srovnání DNA zdravé tkáně a tumoru téhož pacienta (Peinado aj., 1992). Autoři sice prokázali stejné DNA fingerprinty, ale některé amplifikační produkty se vyskytovaly ve zvýšených nebo snížených intenzitách. Dalším došetřením bylo potvrzeno, že v průběhu vzniku tumoru došlo k určitým přestavbám na krátkém raménku chromozomu 17, což mělo za následek nestejnou intenzitu některých amplifikačních produktů.

2.4. Přímé sekvenování

Princip je založen na sekvenování vybrané části genomu organismů a vzájemném porovnání těchto sekvencí. Metoda přímého sekvenování vyčerpávajícím způsobem popisuje daný organismus a pokud je analy-

zovaná oblast dostatečně variabilní, pak poskytuje maximum dostupné informace. Navíc umožňuje zcela jednoduché a plně automatizovatelné porovnávání výsledků mezi jednotlivými laboratořemi. Ve velké většině případů se sekvenují úseky DNA, které byly předtím získány vhodně uspořádanou PCR (Rao, 1994). Sekvenční data jsou využívána k identifikaci a porovnání jednotlivých bakteriálních nebo virových kmenů.

2.4.1. Příklady praktického využití přímého sekvenování

U bakterií se za cílovou sekvenci pro sekvenování nejčastěji využívají geny pro rRNA (Stackebrandt aj., 1992). Weisburg aj. (1991) po přímém sekvenování amplifikačních produktů genů pro rRNA zařadili do fylogenetického systému obtížně kultivovatelného patogena přezvýkavců *Anaplasma marginale*. Roggal aj. (1990) diferencovali na základě sekvenční analýzy rDNA jednotlivé druhy rodu *Mycobacterium*. Frothingham a Wilson (1993) pak na základě sekvenčních údajů diferencovali kmeny *Mycobacterium avium*. Jako cílovou sekvenci zvolili prepisovaný mezerník (internal transcribed spacer) mezi geny pro 16S rRNA a 23S rRNA pro jeho vyšší variabilitu ve srovnání se samotnými geny pro rRNA. Výsledky sekvenování vykazovaly jen velmi nízkou korelaci se sérotypizací. K rodu *Pseudomonas* byl na základě sekvenční analýzy zařazen dosud blíže nespécifikovaný kmen choroby banánovníků (Banana Blood Disease Bacterium), určený jako *Pseudomonas solanacearum* (Seal aj., 1993). Srovnáním vybraných serovarů salmonel na základě sekvenčních údajů se zabývalo několik autorů. K těmto účelům Masten a Joys (1993) sekvenovali vybrané úseky genů pro sestavení bičíků.

U virů se například sekvenováním VPI oblasti viru slintavky a kulhavky podařilo sestavit fylogenetický strom vývoje a do tohoto systému zařadit všechny nově popsané izoláty (Saij aj., 1993).

3. ZÁVĚR

Metody molekulární biologie nabízejí zcela nový pohled na diferenciaci a taxonomii všech živých organismů. Nevýhodou současných DNA typizačních metod je jejich nestandardnost ve smyslu snadné, jasné a přehledné kategorizace a prezentace výsledků. To je patrné zejména při studiu prokaryot a virů, kde jsou zavedeny metody fenotypové typizace. Proto se objevují první pokusy odstranit tuto nevýhodu a využít k analýze poměrně složitých „DNA spekter“ výpočetní techniku (Cott aj., 1993). V naší laboratoři pro zpracování DNA fingerprintů u *Mycobacterium paratuberculosis* (Pavlík aj., 1996) a analýzy plazmidových profilů u salmonel využíváme software Gel Manager (BioSystematica, Anglie). S využitím výpočetní techniky jsme byli schopni dokonce analyzovat DNA fingerprinty publikované v odborné literatuře (Whipple

aj., 1990; De Lisle aj., 1992), porovnat je s našimi výsledky a celkově vyhodnotit. Takovéto zpracování a archivace výsledků odstraňuje dosavadní limity metod DNA typizace a otevírá cestu k exaktnímu popisu a klasifikaci.

4. LITERATURA

- ABADIJEVA, A. – MITEVA, V. – GRIGOROVA, R. (1992): Genomic variations in mosquitoicidal strains of *Bacillus sphaericus* detected by M13 DNA fingerprinting. *J. Invert. Pathol.*, **60**, 5–9.
- ADLER-MOSCA, H. – LUTHY-HOTTENSTEIN, J. – MARTINETTI, G. – LUCCHINI, G. – BURMENS, A. – ALTWEGG, M. (1991): Development of resistance to quinolones in five patients with campylobacteriosis treated with norfloxacin or ciprofloxacin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **10**, 953–956.
- AKOPYANZ, N. – BUKANOV, N. O. – WESTBLOM, T. U. – BERG, D. E. (1992): PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 6221–6225.
- ALOS, J. I. – LAMBERT, T. – COURVALIN, P. (1993): Comparison of two molecular methods for tracing nosocomial transmission of *Escherichia coli* K1 in a neonatal unit. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1704–1709.
- AMJAD, M. – CASTRO, J. M. – SANDOVAL, H. – WU, J. J. – YANG, M. – HENNER, D. J. – PIGGOT, P. J. (1990): An Sfi I restriction map of the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Gene*, **101**, 15–21.
- AZAD, A. K. – COOTE, J. G. – PARTON, R. (1992): Distinct plasmid profiles of *Pasteurella haemolytica* serotypes and the characterization and amplification in *Escherichia coli* of ampicillin-resistance plasmids encoding ROB-1 β -lactamase. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 1185–1196.
- BARYSHEVA, E. V. – BOOKINA, A. M. – PETROVA, N. V. – LIMBORSKAYA, S. A. – GINTER, E. K. (1991): The use of DNA hypervariability detected by DNA of phage M13 in population studies. *Genetika (Russian)*, **27**, 399–403.
- BASSAM, B. J. – CAETANO-ANOLLES, G. – GRESHOFF, P. M. (1992): DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 70–76.
- BAUTCH, W. (1993): Not I macrorestriction analysis suggests a clonal relationship of *Salmonella enterica*, ser. *enteritidis* phage lysotype 4 strains. *Infection*, **21**, 328–330.
- BELKUM, A. van (1994): DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin. Microbiol. Rev.*, **7**, 174–184.
- BIRNBOIM, H. C. – DOLY, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513–1523.
- BJORVATN, B. – LUND, V. – KRISTIANSEN, E. B. – KORSNES, L. – SPANNE, O. – LINDQVIST, B. (1994): Application of restriction endonuclease fingerprinting of chromosomal DNA of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 763–765.
- BLUMBERG, H. M. – RIMLAND, D. – KIEHLBAUCH, J. A. – TERRY, P. M. – WACHSMUTH, I. K. (1992): Epi-

- demiologic typing of *Staphylococcus aureus* by DNA restriction fragment length polymorphism of rDNA genes: Elucidation of the clonal nature of a group of bacteriophage-nontypeable, ciprofloxacin-resistant, methicillin-susceptible *S. aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 362-369.
- BOHM, H. – KARCH, H. (1992): DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157 : H7 by pulse-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 2169-2172.
- BRDIČKA, R. – NURNBERG, P. (1993): Checking of individuality by DNA profiling. *J. Chrom.*, 618, 167-179.
- BROUSSEAU, R. – SAINT-ONGE, A. – PREFONTAINE, G. – MASSON, L. – CABANA, J. (1993): Arbitrary primed polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 114-119.
- BROWN, D. J. – BAGGESEN, D. L. – HANSEN, H. B. – HANSEN, H. C. – BISGAARD, M. (1994): The characterization of Danish isolates of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* by phage typing and plasmid profiling: 1980-1990. *APMIS*, 102, 208-214.
- CAETANO-ANOLLES, G. – BASSAM, B. J. (1993): DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Biochem. Biotechnol.*, 42, 189-200.
- CAETANO-ANOLLES, G. – BASSAM, B. J. – GRES-SHOFF, P. M. (1991a): DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant. Mol. Biol. Reporter* 9.
- CAETANO-ANOLLES, G. – BASSAM, B. J. – GRES-SHOFF, P. M. (1991b): DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, 9, 553-557.
- CAETANO-ANOLLES, G. – BASSAM, B. J. – GRES-SHOFF, P. M. (1992): Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol. Gen. Genet.*, 235, 157-162.
- CANCILLA, M. R. – POWELL, I. B. – HILLIER, A. J. – DAVIDSON, B. E. (1992): Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with 32P and fluorescent labels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1772-1775.
- CHOWDRY, N. – THRELFALL, E. J. – ROWE, B. – STANLEY, J. (1993): Genotype analysis of faecal and blood isolates of *Salmonella dublin* from humans in England and Wales. *Epidemiol. Infect.*, 110, 217-225.
- COHEN, S. N. (1975): The manipulation of genes. *Sci. Am.*, 233, 24-33.
- CORICH, V. – GIACOMINI, A. – OLLERO, F. J. – SQUARTINI, A. – NUTI, M. F. (1991): Pulse-field electrophoresis in contour-clamped homogeneous electric fields (CHEF) for the fingerprinting of *Rhizobium* spp. *FEMS Microbiol. Lett.*, 83, 193-198.
- CRAWFORD, A. M. – BUCHANAN, F. C. – FRASER, K. M. – ROBINSON, A. J. – HILL, D. F. (1991): Repeat sequence from complex dsDNA viruses can be used as minisatellite probes for DNA fingerprinting. *Anim. Genet.*, 22, 177-181.
- DASI, M. A. – NOGUEIRA, J. M. – CAMARENA, J. J. – GIL, C. – GARCIA-VERDU, R. – BARBERA, J. L. – BARBERA, J. (1992): Genomic fingerprinting of penicillinase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Valencia, Spain. *Gen. Med.*, 68, 170-173.
- DECORTE, R. – CASSIMAN, J. J. (1993): Forensic application of the polymerase chain reaction. *J. Med. Genet.*, 30, 625-630.
- DE LISLE, G. W. – COLLINS, D. M. – HUCHZERMAYER, H. A. K. (1992): Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Vet. Res.*, 59, 163-165.
- DE MURO, M. A. – MITCHELL, W. J. – PRIEST, F. G. (1992): Differentiation of mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from non-toxic varieties by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1159-1166.
- DOLL, L. – MOSHITCH, S. – FRANKEL, G. (1993): Poly(GTG)_n-associated profiles of *Salmonella* and *Shigella* genomic DNA. *Res. Microbiol.*, 144, 17-24.
- EPPLEN, J. T. (1992): Diagnostic applications of repetitive DNA sequences. *Clin. Chim. Acta*, 209, 5-13.
- EZQUERRA, E. – BURNENS, A. P. – FRITH, K. – COSTAS, M. – STANLEY, J. (1993): Molecular genotype analysis of *Salmonella bovis* serovar *bovis*. *Mol. Cell. Probes*, 7, 45-54.
- FANTASIA, M. – FILETICI, E. – ANASTASIO, M. P. – MARCOZZI, M. D. – GRAMENZI, M. P. – AURELI, P. (1991): Italian experience in *Salmonella enteritidis* 1978-1988: characterization of isolates from food and man. *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 353-362.
- FERRIS, K. E. – ANDREWS, JR. R. E. – THOEN, C. O. – BLACKBURN, B. O. (1992): Plasmid profile analysis, phage typing, and antibiotic sensitivity of *Salmonella dublin* from clinical isolates in the United States. *Vet. Microbiol.*, 32, 51-62.
- FRANKLIN, A. – LINNE, T. – REHBINDER, V. (1990): Plasmid profile analysis and restriction enzyme fingerprinting of *Salmonella* DO-group strains. *APMIS*, 98, 665-668.
- FROTHINGHAM, R. – WILSON, K. H. (1993): Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.*, 175, 2818-2825.
- GATEI, M. H. – CHEN, P. M. – DANIEL, R. C. W. – LAVIN, M. F. (1991): DNA fingerprinting of sheep using an M13 probe. *Anim. Genet.*, 22, 285-289.
- GIBERT, I. – BARBE, J. – CASADESUS, J. (1990): Distribution of insertion sequence IS200 in *Salmonella* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.*, 136, 2555-2560.
- GILL, P. – JEFFREYS, A. J. – WERRETT, D. J. (1985): Forensic application of DNA fingerprints. *Nature*, 318, 577-579.
- GRASER, Y. – MEYER, W. – HALLE, E. – PRESBER, W. – SCHONIAN, G. (1993): Optimization of a PCR-based assay for fingerprinting microorganisms. *Med. Microbiol. Lett.*, 2, 379-385.
- GRUNER, E. – LUCCHINI, G. M. – HOOP, R. K. – ALTWEGG, M. (1994): Molecular epidemiology of *Salmonella enteritidis*. *Eur. J. Epidemiol.*, 10, 85-89.
- HAERTL, R. – BANDLOW, G. (1993): Epidemiological fingerprinting of *Enterobacter cloacae* by small-fragment restriction endonuclease analysis and pulse-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 128-133.
- HANAHAN, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580.
- HARRISON, S. P. – MYTTON, L. R. – SCOT, L. – DYE, M. – CRESSWELL, A. (1992): Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. *Can. J. Microbiol.*, 38, 1009-1015.
- HARTSTEIN, A. I. – MORTHLAND, V. H. – RASHAD, A. L. (1991): Reproducibility of *Staphylococcus aureus* plasmid profiles. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 14, 275-280.

- HARTSTEIN, A. I. – PHELPS, CH. L. – KWOK, R. Y. Y. – MULLIGAN, M. E. (1995): *In vivo* stability and discriminatory power of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing by restriction endonuclease analysis of plasmid DNA compared with those of other molecular methods. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2022–2026.
- HELMUTH, R. VON – MONTENEGRO, M. A. – STEINBECK, A. – SEILER, A. – PIETZSCH, O. (1990): Molekularbiologische Methoden zur epidemiologischen Feincharakterisierung von Krankheitserregern am Beispiel von *Salmonella enteritidis* aus Geflügel. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, **103**, 416–421.
- HULTON, C. S. J. – HIGGINS, C. F. – SHARP, P. M. (1991): ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.*, **5**, 825–834.
- ICHIYAMA, S. – OHTA, M. – SHIMOKATA, K. – KATO, N. – TAKEUCHI, J. (1991): Genomic DNA fingerprinting by pulse-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2690–2695.
- IZARD, N. C. – HACHLER, H. – GREHN, M. – KAYSER, F. H. (1992): Ribotyping of coagulase-negative *Staphylococci* with special emphasis on intraspecific typing of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 817–823.
- JAYARAO, B. M. – BASSAM, B. J. – CAETANO-ANOLLES, G. – GRESSHOFF, S. P. – OLIVER, S. P. (1992): Subtyping of *Streptococcus uberis* by DNA amplification fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1347–1350.
- JEFFREYS, A. J. – BROOKFIELD, J. F. Y. – SEMEONOFF, R. (1985a): Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, **317**, 818–819.
- JEFFREYS, A. J. – WILSON, V. – THEIN, S. L. (1985b): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, **314**, 67–73.
- JEFFREYS, A. J. – WILSON, V. – THEIN, S. L. (1985c): Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, **316**, 76–79.
- JUCKER, M. T. – FALKINHAM, J. O. III. (1990): Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. IX. Evidence for two DNA homology groups among small plasmids in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **142**, 858–862.
- KADO, C. I. – LIU, S. T. (1981): Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, **145**, 1365–1373.
- KATOULI, M. – KUHN, I. – BRAUNER, A. – FARHOUDI-MOGHADDAM, A. A. – MOLLBY, R. (1992a): Application of biochemical fingerprinting to the investigation of clonal groups of *Salmonella* of serotype *Havana*. *J. Med. Microbiol.*, **36**, 382–388.
- KATOULI, M. – WOLLIN, R. – KUHN, I. – FARHOUDI-MOGHADDAM, A. A. – MOLLBY, R. (1992b): The use of biochemical fingerprinting, phage typing and antimicrobial-susceptibility testing in the detection of epidemic strains of *Salmonella* of serotype *Typhimurium* in Iran. *J. Med. Microbiol.*, **37**, 252–257.
- KATOULI, M. – SEUFFER, R. H. – WOLLIN, R. – KUHN, I. – MOLLBY, R. (1993): Variations in biochemical phenotypes and phage types of *Salmonella enteritidis* in Germany 1980–1992. *Epidemiol. Infect.*, **111**, 199–207.
- KUHN, I. – ALLESTAM, G. – STENSTROM, T. A. – MOLLBY, R. (1991): Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3171–3177.
- KUNSTMANN, E. – BOCKER, T. – ROEWER, L. – SAUER, H. – MEMPEL, W. – EPPLER, J. T. (1992): Diagnosis of transfusion-associated versus graft-versus-host disease by genetic fingerprinting and polymerase chain reaction. *Transfusion*, **32**, 766–770.
- LAGUERRE, G. – MAZURIER, S. I. – AMARGER, N. (1992): Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEMS Microbiol. Lett.*, **101**, 17–26.
- LE BOURGEOIS, P. – LAUTIER, M. – MATA, M. – RITZENTHALER, P. (1992): Physical and genetic map of the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *J. Bacteriol.*, **124**, 6752–6762.
- LÉVY-FREBAULT, V. V. – THOREL, M. F. – VARNEROT, A. – GICQUEL, B. (1989): DNA polymorphism in *Mycobacterium paratuberculosis* „Wood pigeon mycobacteria,” and related mycobacteria analyzed by field inversion gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 2823–2826.
- LIEBISCH, B. – SCHWARZ, S. (1996): Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* isolates. *J. Med. Microbiol.*, **44**, 52–59.
- LIU, S. L. – SANDERSON, K. E. (1992): A physical map of the *Salmonella typhimurium* LT2 genome made by using Xba I analysis. *J. Bacteriol.*, **174**, 1662–1672.
- LUBJUHN, T. – EPPLER, C. – BRUN, J. – EPPLER, J. T. (1993): Multilocus fingerprinting using oligonucleotide probes reveals a highly polymorphic single locus system in great tits *Parus major*. *Mol. Ecol.*, **2**, 269–270.
- MARRANZANO, M. – GULISANO, M. – AGODI, A. (1995): Plasmid content in different serovars of *Salmonella* isolated in Sicily: An ecology study. *Microbiologica*, **18**, 35–40.
- MARTINETTI, G. – ALTWEGG, M. (1990): rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *Salmonella enteritidis*. *Res. Microbiol.*, **141**, 1151–1162.
- MARTINI, A. – FILETICI, E. – FANTASIA, M. (1992): Epidemiological markers of *Salmonella typhimurium* isolates in Rome. *J. Med. Microbiol.*, **37**, 104–108.
- MASAKI, S. – KONISHI, T. – SUGIMORI, G. – OKAMOTO, A. – HAYASHI, Y. – KUZE, F. (1989): Plasmid profiles of *Mycobacterium avium* complex isolated from swine. *Microbiol. Immunol.*, **33**, 429–435.
- MASTEN, B. – JOYS, T. M. (1993): Molecular analysis of the *Salmonella* g... flagellar antigen complex. *J. Bacteriol.*, **175**, 5359–5365.
- MAZURIER, S. I. – WERNARS, K. (1992): Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. *Res. Microbiol.*, **143**, 499–505.
- MCCABÉ, E. R. B. (1992): Application of DNA fingerprinting in pediatric practise. *J. Pediatr.*, **120**, 499–509.
- MENARD, C. – BROUSSEAU, R. – MOUTON, C. (1992): Application of polymerase chain reaction with arbitrary primer (AP-PCR) to strain identification of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **95**, 163–168.
- MENCARELLI, M. – MARSILI, C. – ZANCHI, A. – PANTINI, C. – CELLESI, C. (1993): Genomic DNA fingerprints

- and phenotypic characteristics of serotype B *Haemophilus influenzae* isolates in Italy. *Eur. J. Epidemiol.*, **9**, 353–360.
- MEUNIER, J. R. – GRIMONT, P. A. D. (1993): Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.*, **144**, 373–379.
- MEYER, W. – KOCH, A. – NIEMANN, C. – BEYER-MANN, B. – EPPLER, J. T. – BORNER, T. (1991): Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. *Curr. Genet.*, **19**, 239–242.
- MICHEL, M. R. – BOVA, R. – PASCALE, E. – DAMBROSIO, E. (1994): Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 1921–1922.
- MILLEMANN, Y. – LESAGE, M. C. – CHASLUS-DANCLA, E. – LAFONT, J. P. (1995): Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 173–179.
- MILLEMANN, Y. – LESAGE-DESCAUSES, M. C. – LAFONT, J. P. – CHASLUS-DANCLA, E. (1996): Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **14**, 129–134.
- MITEVA, V. I. – ABADIJEVA, A. N. – STEFANOVA, T. T. (1992): M13 DNA fingerprinting, a new tool for classification and identification of *Lactococcus* spp. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 349–354.
- NASTASI, A. – MAMMINA, C. – VILLAFRATE, M. R. – SCARLATA, G. – MASSENTI, M. F. – DIQUATTRO, M. (1988): Multiple typing of *Salmonella typhimurium* isolates: an epidemiological study. *Microbiologica*, **11**, 173–178.
- NASTASI, A. – MAMMINA, C. – VILLAFRATE, M. R. (1991): rDNA fingerprinting as a tool in epidemiological analysis of *Salmonella typhimurium* infections. *Epidemiol. Infect.*, **107**, 565–576.
- NATH, K. – DEVLIN, D. – BEDDOE, A. M. (1992): Heterogeneity in restriction patterns of *Gardnerella vaginalis* isolates from individuals with bacterial vaginosis. *Res. Microbiol.*, **143**, 199–209.
- NISHIMI, R. Y. (1992): Forensic DNA analysis: scientific, legal, and social issues. *Cancer Invest.*, **10**, 553–563.
- OLSEN, J. E. – BROWN, D. J. – BAGGESEN, D. L. – BISGAARD, M. (1992a): Biochemical and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar *berta*, and comparison of methods for typing. *Epidemiol. Infect.*, **108**, 243–260.
- OLSEN, J. E. – SORENSEN, M. – BROWN, D. J. – GAAR-SLEV, K. – BISGAARD, M. (1992b): Plasmid profiles as an epidemiological marker in *Salmonella enterica* serovar *berta* infections. *APMIS*, **100**, 221–228.
- OLSEN, J. E. – SKOV, M. N. – THRELFALL, E. J. – BROWN, D. J. (1994a): Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* documented by IS200-, ribo-, pulse-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J. Med. Microbiol.*, **40**, 15–22.
- OLSEN, J. E. – BROWN, D. J. – BAGGESEN, D. L. – BISGAARD, M. (1994b): Stability of plasmids in five strains of *Salmonella* maintained in stab culture at different temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**, 155–159.
- OTT, M. – BENDER, L. – MARRE, R. – HACKER, J. (1991): Pulse field electrophoresis of genomic restriction fragments for the detection of nosocomial *Legionella pneumophila* in hospital water supplies. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 813–815.
- PANTUČEK, P. – GOTZ, F. – DOŠKAŘ, J. – ROZSYPAL, S. (1996): Genomic variability of *Staphylococcus aureus* and the other coagulase-positive *Staphylococcus* species estimated by macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 216–222.
- PAVLÍK, I. – BEJČKOVÁ, L. – FIXA, B. – KOMÁRKOVÁ, O. – BEDRNA, J. (1994): DNA fingerprinting as a tool for epidemiological studies of paratuberculosis in ruminants and Crohn's disease. In: Proc. 4th Int. Colloquium on Paratuberculosis, July 17–21, 1994, Cambridge, U.K., ISBN 0-9633043-2-1, pp. 279–289.
- PAVLÍK, I. – BEJČKOVÁ, L. – PAVLAS, M. – ROZSYPALOVÁ, Z. – KOSKOVÁ, S. (1995): Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.*, **45**, 311–318.
- PAVLÍK, I. – BARTL, J. – HORVÁTHOVÁ, A. – RYCHLÍK, I. (1996): Study of pathogenesis and epidemiology of paratuberculosis using DNA fingerprinting. In: Proc. 5th Int. Colloquium on Paratuberculosis, September 29–October 4, 1996, Madison, Wisconsin, U.S.A., in press.
- PEDERSEN, K. – CESCHIA, G. – LARSEN, J. L. (1994): Ribotypes of *Vibrio anguillarum* O1 from Italy and Greece. *Curr. Microbiol.*, **28**, 97–99.
- PEILLON, R. – DROUET, E. B. – BRUNEAU, S. – PANTEIX, G. – DENOYEL, G. A. – DEMONTCLOS, H. P. (1994): Discrimination of *Mycobacterium avium* – *Mycobacterium intracellulare* strains by genomic DNA fingerprinting with a 16S rRNA gene probe. *FEMS Microbiol. Lett.*, **124**, 75–79.
- PEINADO, M. A. – MALKHOSYAN, S. – VELAZQUEZ, A. – PERUCHO, M. (1992): Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 10065–10069.
- PELKONEN, S. – ROMPPANEN, E. L. – SIITONEN, A. – PELKONEN, J. (1994): Differentiation of *Salmonella* serovar *infantis* isolates from human and animal sources by fingerprinting IS200 and 16S rRNA loci. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2128–2133.
- PIGNATARI, A. – BOYKEN, L. D. – HERWALDT, L. A. – HOLLIS, R. – LEME, I. – SESSO, R. – PFALLER, M. A. (1992): Application of restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA in the study of *Staphylococcus aureus* colonization in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, **15**, 195–199.
- POHL, P. – LINTERMANS, P. – MARIN, M. – COUTURIER, M. (1991): Epidemiological study of *Salmonella enteritidis* strains of animal origin in Belgium. *Epidemiol. Infect.*, **106**, 11–16.
- POWELL, N. G. – THRELFALL, E. J. – CHART, H. – ROWE, B. (1994): Subdivision of *Salmonella enteritidis* PT 4 by pulsed-field gel electrophoresis: Potential for epidemiological surveillance. *FEMS Microbiol. Lett.*, **119**, 193–198.
- PREHEIM, L. – PITCHER, D. – OWEN, R. – COOKSON, B. (1991): Typing of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* strains by ribosomal RNA gene restriction patterns using biotinylated probe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **10**, 428–436.

- PREVOST, G. – JAULHAC, B. – PIEMONT, Y. (1992): DNA fingerprinting by pulse-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, *30*, 967–973.
- RAMIREZ-SANTOS, J. – ALVAREZ, G. – CISNEROS, E. – GOMEZ – EICHELHANN, M. C. (1992): Distribution of insertion sequence IS1 in multiple-antibiotic resistant clinical *Enterobacteriaceae* strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, *93*, 189–194.
- RAMOS, M. S. – HARLANDER, S. K. (1990): DNA fingerprinting of lactococci and streptococci used in dairy fermentations. *Appl. Microbiol. Biotech.*, *34*, 368–374.
- RAO, V. B. (1994): Direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Anal. Biochem.*, *216*, 1–14.
- ROGGAL, T. – FLOHR, T. – BOTTGER, E. C. (1990): Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J. Gen. Microbiol.*, *136*, 1915–1920.
- RYCHLIK, I. – BEJČKOVÁ, L. (1994): Oligonucleotide (GTG)₅ is a suitable tool for bacterial DNA fingerprinting. *Vet. Med.-Czech.*, *39*, 567–578.
- RYCHLÍK, I. – ŠIŠÁK, F. – LÁNY, P. (1993): Differentiation of *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* by plasmid profile analysis and restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. *Vet. Med.-Czech.*, *38*, 433–439.
- RYCHLÍK, I. – BARTOŠ, M. – SEŠTÁK, K. (1994a): Use of DNA fingerprinting for accurate typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Med. Czech.*, *39*, 167–174.
- RYCHLÍK, I. – KUBÍČEK, O. – HOLČÁK, V. – BARTA, J. – PAVLÍK, I. (1994b): DNA fingerprinting in *Falconidae*. *Vet. Med.-Czech.*, *39*, 111–116.
- RYCHLÍK, I. – MAJNOVÁ, M. – ŠIŠÁK, F. (1995): Využití DNA typizace pro analýzu kmenů *Salmonella enteritidis*. In: Sbor. Ref. 20. sjezd Československé společnosti mikrobiogické, 18.–21. září 1995, Ostrava.
- SAIKI, R. K. – SCHARF, S. – FALOONA, F. – MULLIS, K. B. – HORN, G. – ERLICH, H. A. – ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, *236*, 1350–1354.
- SAIKI, R. K. – BUGAWAN, T. L. – HORN, G. T. – MULLIS, K. B. – ERLICH, H. A. (1986): Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQA DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, *324*, 163–166.
- SAIKI, R. K. – GELFAND, D. H. – STOFFEL, S. – SCHARF, S. J. – HIGUCHI, R. – HORN, G. T. – MULLIS, K. B. – ERLICH, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, *239*, 487–491.
- SAIZ, J. C. – SOBRINO, F. – DOPAZO, J. (1993): Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus type O. *J. Gen. Virol.*, *74*, 2281–2285.
- SCHILDKRAUT, C. L. – MARMUR, J. – DOTY, P. (1961): The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. *J. Mol. Biol.*, *3*, 595–617.
- SCIEUX, C. – GRIMONT, F. – REGNAULT, B. – GRIMONT, P. A. D. (1992): DNA fingerprinting of *Chlamydia trachomatis* by use of ribosomal RNA, oligonucleotide and randomly cloned DNA probes. *Res. Microbiol.*, *143*, 755–765.
- SCOTT, D. A. – WELT, M. – LEUNG, F. C. (1993): A computer program to aid in calculating similarity indexes from DNA fingerprints. *Biotechniques*, *14*, 980–983.
- SEAL, S. E. – JACKSON, L. A. – YOUNG, J. P. W. – DANIELS, M. J. (1993): Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16SrRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.*, *139*, 1587–1594.
- SHARPLES, G. J. – LLOYD, R. G. (1990): A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucl. Acids Res.*, *18*, 6503–6508.
- SINHA, R. P. (1992): Plasmid instability in *Lactobacillus plantarum* strain caTC2. *Curr. Microbiol.*, *25*, 219–223.
- SOUTHERN, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gele electrophoresis. *J. Mo. Biol.*, *98*, 503–517.
- STACKEBRANDT, E. – LIESACK, W. – WITT, D. (1992): Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. *Gene*, *115*, 255–260.
- STANLEY, J. – BURNENS, A. P. – LINTON, D. – ON, S. L. W. – COSTAS, M. – OWEN, R. J. (1992a): *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. *J. Gen. Microbiol.*, *138*, 2293–2303.
- STANLEY, J. – BURNENS, A. – POWELL, N. – CHOWDRY, N. – JONES, C. (1992b): The insertion sequence IS200 fingerprints chromosomal genotypes and epidemiological relationship in *Salmonella heidelberg*. *J. Gen. Microbiol.*, *138*, 2329–2336.
- STANLEY, J. – GOLDSWORTHY, M. – THRELFALL, E. J. (1992c): Molecular phylogenetic typing of pandemic isolates of *Salmonella enteritidis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, *90*, 153–160.
- STANLEY, J. – MORENO, M. J. – JONES, C. – OWEN, R. J. (1992d): Molecular typing of *Helicobacter pylori* by chromosomal and plasmid DNA organization. *Mol. Cel. Probe*, *6*, 305–312.
- STANLEY, J. – POWELL, N. – JONES, C. – BURNENS, A. P. (1994): A framework for IS200, 16S rRNA gene and plasmid-profile analysis in *Salmonella* serogroup D1. *J. Med. Microbiol.*, *41*, 112–119.
- STRUELENS, M. J. – BAX, R. – DEPLANO, A. – QUINT, W. G. V. – VAN BELKUM, A. (1993): Concordant clonal delineation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain reaction fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, *31*, 1964–1970.
- STUBBS, A. D. – HICKMANBRENNER, F. W. – CAMERON, D. N. – FARMER, J. J. (1994): Differentiation of *Salmonella enteritidis* phage type-8 strains – evaluation of 3 additional phage typing systems, plasmid profiles, antibiotic susceptibility patterns, and biotyping. *J. Clin. Microbiol.*, *32*, 199–201.
- SULLIVAN, D. – BENNETT, D. – HENMAN, M. – HARWOOD, P. – FLINT, S. – MULCAHY, F. – SHANLEY, D. – COLEMAN, D. (1993): Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida species* other than *C. albicans* and of atypical *Candida* from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.*, *31*, 2124–2133.
- SUZUKI, Y. – ISHIHARA, M. – MATSUMOTO, M. – ARAKAWA, S. – SAITO, M. – ISHIKAWA, N. – YOKOCHI, T. (1995): Molecular epidemiology of *Salmonella enteritidis*. An outbreak and sporadic cases studied by means of pulsed-field gel electrophoresis. *J. Infect.*, *31*, 211–217.

- TASSANAKAJON, A. – WONGTEERASAPAYA, C. – PUMICHOTI, P. – BOONSAENG, V. – PANYIM, S. (1991): Improved resolution and sensitivity of human DNA fingerprinting by specific primed labelling of M13 DNA. *Mol. Cell. Probe*, **5**, 111–115.
- TVETEN, Y. – KRISTIANSEN, B. E. – ASK, E. – JENKINS, A. – HOFSTAD, T. (1991): DNA fingerprinting of isolates of *Staphylococcus aureus* from newborns and their contacts. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1100–1105.
- TZURI, G. – HILLEL, J. – LAVI, U. – HABERFELD, A. – VAINSTEIN, A. (1991): DNA fingerprinting analysis of ornamental plants. *Plant Sci.*, **76**, 91–97.
- USERA, M. A. – ALADUENA, A. – ECHEITA, A. – AMOR, E. – GOMEZ-GARCES, J. L. – IBANEZ, C. – MENDEZ, I. – SANZ, J. C. – LOPEZ-BREA, M. (1993): Investigation of an outbreak of *Salmonella typhimurium* in a public school in Madrid. *Eur. J. Epidemiol.*, **9**, 251–254.
- VOSMAN, B. – ARENS, P. – RUS-KORTEKAAS, W. – SMULDERS, M. J. M. (1992): Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. *Theor. Appl. Genet.*, **85**, 239–244.
- WEGENER, H. C. – BAGGESEN, D. L. – GAARSLEV, K. (1994): *Salmonella typhimurium* phage types from human salmonellosis in Denmark 1988–1993. *APMIS*, **102**, 521–525.
- WEIHE, A. – NIEMANN, C. – LIECKFELD, D. – MEYER, W. – BORNER, T. (1990): An improved hybridization procedure for DNA fingerprinting with bacteriophage M13 as a probe. *Fingerprint News*, **2**, 9–10.
- WEISBURG, W. G. – BARNES, S. M. – PELLETIER, D. A. – LANE, D. J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697–703.
- WELSH, J. – HONEYCUTT, R. J. – MCCLELLAND, M. – SOBRAL, B. W. S. (1991): Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor. Appl. Genet.*, **82**, 473–476.
- WELSH, J. – CHADA, K. – DALAL, S. S. – CHENG, R. – RALPH, D. – MCCLELLAND, M. (1992a): Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4965–4970.
- WELSH, J. – PRETZMAN, C. – POSTIC, D. – GIRONS, I. S. – BARANTON, G. – MCCLELLAND, M. (1992b): Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phylogenetic groups. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **12**, 370–377.
- WETMUR, J. G. (1976): Hybridization and renaturation kinetics of nucleic acids. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **5**, 337–361.
- WETMUR, J. G. (1991): DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **26**, 227–259.
- WHIPPLE, D. L. – KAPKE, P. A. – ANDERSEN, P. R. (1990): Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2561–2564.
- WILSON, M. A. – RIMLER, R. B. – HOFFMAN, L. J. (1992): Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup Band E *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1518–1524.
- WOODS, C. R. – VERSALOVIC, J. – KOEUTH, T. – LUPSKI, J. R. (1993): Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationship of bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1927–1931.
- YAN, W. – CHANG, N. – TAYLOR, D. E. (1991): Pulse-field electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiological application. *J. Infect. Dis.*, **163**, 1068–1072.
- YAROVVOY, B. P. – MEZHVEVAYA, E. V. – STEPANOVA, V. P. – ZAKHAROV, I. A. (1991): Rearrangements of yeast chromosomes revealed by pulse field gel electrophoresis. *Genetika (Russian)*, **27**, 636–643.
- ZISCHLER, H. – NANDA, I. – SCHAFER, R. – SCHMID, M. – EPPLER, J. T. (1989): Digoxigenated oligonucleotide probes specific for simple repeats in DNA fingerprinting and hybridization *in situ*. *Hum. Genet.*, **82**, 227–233.

Received: 96–12–03

Accepted: 96–12–31

Kontaktní adresa:

RNDr. Ivan Rychlík, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29, e-mail: olma@vuvel.anet.cz



The Royal Veterinary College
University of London
presents

In conjunction with the MSc Course in Food Animal Health
and Veterinary Animal Microbiology

MICROBIOLOGY OF FOODS OF ANIMAL ORIGIN

A Five-day Basic Introductory Course
Monday 12th to Friday 16th May 1997

At The Royal Veterinary College, Camden Town

Details and registration form from:
Maggie McEvoy, UVCE, The Royal Veterinary College
Royal College St, London NW1 OTU
Tel.: 0171 468 5170
Fax: 0171 383 0615
E-mail: jtaylor@rvc.ac.uk

POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem. Časopis zveřejňuje i názory, postřehy a připomínky čtenářů ve formě kurzívy, glosy, dopisu redakci, diskusního příspěvku, kritiky zásadního článku apod., ale i zkušenosti z cest do zahraničí, z porad a konferencí.

Autoři jsou plně odpovědní za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetel k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce imprimitované vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením všech autorů, že se zveřejněním souhlasí.

Rozsah původních prací nemá přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI.

Rukopis má být napsán na papíře formátu A4 (30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořízenou na PC s uvedením použitého programu. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

Název práce (titul) nemá přesáhnout 85 úhozů a musí dát přesnou představu o obsahu práce. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

Krátký souhrn (Abstrakt) musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo v práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě.

Rozšířený souhrn prací v češtině nebo slovenštině je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky popř. na nejdůležitější literární údaje. Je vhodné jej (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

Literární přehled má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému. Tato úvodní část přináší také informaci, proč byla práce provedena.

Metoda se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál a způsob hodnocení výsledků.

Výsledky tvoří hlavní část práce a při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani deduce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostacích a výsledky se konfrontují s údaji publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu spolu s výsledky.

Literatura citovaná v textu práce se uvádí jménem autora a rokem vydání. Do seznamu se zařadí jen publikace citované v textu. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů.

Klíčová slova mají umožnit vyhledání práce podle sledovaných druhů zvířat, charakteristik jejich zdravotního stavu, podmínek jejich chovu, látek použitých k jejich ovlivnění apod. Jako klíčová slova není vhodné používat termíny uvedené v nadpisu práce.

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PŠC, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short or a longer summary. The journal also publishes readers' views, remarks and comments in form of a text in italics, gloss, letter to the editor, short contribution, review of a major article, etc., and also experience of stays in foreign countries, meetings and conferences.

The authors are fully responsible for the originality of their papers, for its subject and formal correctness. The authors shall make a written declaration that their papers have not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper. The editors accept papers approved to print by the head of the workplace or papers with all the authors' statement they approve it to print.

The extent of original papers shall not exceed ten typescript pages, including tables, figures and graphs.

Manuscript should be typed on standard paper (quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript). A PC diskette with the paper text or graphical documentation should be provided with the paper manuscript, indicating the used editor program. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

The **title** of the paper shall not exceed 85 strokes and it should provide a clear-cut idea of the paper subject. Subtitles of the papers are not allowed either.

Abstract. It must present information selection of the contents and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes and comprise base numerical data including statistical data.

Introduction has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form. This introductory section also provides information why the study has been undertaken.

Review of literature should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material and the method of result evaluation.

In the section **Results**, which is the core of the paper, figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

Discussion contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections Results and Discussion may be presented as one section only.

References in the manuscript are given in form of citations of the author's name and year of publication. A list of references should contain publications cited in the manuscript only. References are listed alphabetically by the first author's name.

Key words should make it possible to retrieve the paper on the basis of the animal species investigated, characteristics of their health, husbandry conditions, applied substances, etc. The terms used in the paper title should not be used as keywords.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telephone and fax number, or e-mail.

CONTENTS

Kočišová J., Szanyiová M., Faix Š., Leng L.: The effect of low protein diet on the epithelium of nephron segments in sheep.....	93
Alexa P., Rychlík I., Nejezchleb A., Hamřík J.: Identification of enterotoxin-producing strains of <i>Escherichia coli</i> by PCR and biological methods.....	97
Benda P., Vyletělová M., Ticháček A.: A method of prevalence estimation of intramammary <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Streptococcus agalactiae</i> infections in herds by examination of bulk milk samples	101
REVIEW ARTICLE	
Rychlík I., Pavlík I.: Molecular genetics methods in identification and differentiation of bacterial strains and species.....	111
BOOK REVIEWS	
Pospíšil L.: E. F. Smidak: J'accuse. Environment and Smidak Principles.....	96
Kizek R.: Donald et Judith G. Voet: Biochemistry.....	110

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

OBSAH

Kočišová J., Szanyiová M., Faix Š., Leng L.: Vplyv nízkobielkovinovej diéty na epitel segmentov nefrónu oviec.....	93
Alexa P., Rychlík I., Nejezchleb A., Hamřík J.: Detekce enterotoxigenních kmenů <i>Escherichia coli</i> PCR a biologickými metodami.....	97
Benda P., Vyletělová M., Ticháček A.: Metoda odhadu prevalence intramamárních infekcí <i>Staphylococcus aureus</i> a <i>Streptococcus agalactiae</i> ve stádech na základě vyšetření bazénových vzorků mléka....	101
PŘEHLED	
Rychlík I., Pavlík I.: Využití metod molekulární genetiky při identifikaci a diferenciaci bakteriálních druhů a kmenů.....	111
RECENZE	
Pospíšil L.: E. F. Smidak: J'accuse. Environment and Smidak Principles.....	96
Kizek R.: Donald et Judith G. Voet: Biochemistry.....	110