

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

16. srpna 1999

Ústav zemědělských
a potravinářských informací
ústřední zemědělská a lesnická knihovna
Slezská 7, 120 56 Praha 2

8

VOLUME 44
PRAHA
AUGUST 1999
ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gesci České akademie zemědělských věd

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

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., Reinfeld, Switzerland

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

Dr. Milan Fránek, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Ivan Herzig, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

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

Prof. MUDr. Drahomír Horký, 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

Doc. MVDr. Dr. Jozef Laurinčík, DrSc., Institute of Genetics and Experimental Biology, RIAP, Nitra, Slovak 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.,

Jilové u Prahy, Czech Republic

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

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

World Wide Web (URL): <http://www.clark.cz/vri/casopis.htm>

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 44 vychází v roce 1999.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve třech vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Zdeňka Radošová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Česká republika. Tel.: +420 2 24 25 79 39, fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Podrobné pokyny pro autory jsou v redakci a na URL adrese <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>.

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 1999 je 696 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 44 appearing in 1999.

Acceptance of manuscripts: Three 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, Czech Republic. Tel.: +420 2 24 25 79 39, fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Detailed instructions for authors are available in the editorial office and at URL address <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>.

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 1999 is 159 USD (Europe), 167 USD (overseas).

THE USE OF IMMUNOMAGNETIC SEPARATION IN DETECTION OF SALMONELLA AND LISTERIA FROM FOODSTUFFS*

VYUŽITÍ METODY IMUNOMAGNETICKÉ SEPARACE PŘI STANOVENÍ SALMONEL A LISTERIÍ V POTRAVINÁCH

R. Karpíšková, M. Holasová

National Institute of Health in Prague, Center for Food Chain Hygiene, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Immunomagnetic separation (IMS) and conventional methods (ISO guidelines) were used for the routine testing of various foodstuffs for the presence of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. The total of 408 food samples (milk, egg, and meat products, raw meat, confectionary, vegetable and fruit products) were examined for the presence of *Salmonella* spp. and 33 samples (8%) were positive using conventional methods. Using IMS 49 (12%) of them were positive. A higher number of false negative results was obtained in milk powder using conventional methods compared to the IMS technique. The sensitivity of IMS was higher than in conventional methods (ISO 6579). The statistical differences were of great significance especially when using Rappaport Vassiliadis medium ($p = 0.01$). The number of 375 food samples (milk products, raw meat and meat products) were examined for the presence of *Listeria* spp., 81 samples (21.6%) were positive using conventional methods and 91 (24.3%) were positive using IMS. The statistical differences were significant when using the USDA method ($p = 0.05$) and there were no significant differences between IMS and FDA method. Our results demonstrated that the IMS technique was either more sensitive than or as sensitive as the conventional detection procedures and saved at least one day eliminating the selective enrichment step.

Salmonella spp.; *Listeria* spp.; techniques; immunomagnetic separation; foodstuffs

ABSTRAKT: K rutinnímu sledování přítomnosti salmonel a listerií v potravinách byly použity metody imunomagnetické separace (IMS) a konvenční metody (příslušné normy ISO). Celkem 408 vzorků potravin (výrobky z mléka, vejce, syrové maso, masné výrobky, cukrářské, zeleninové a ovocné výrobky) bylo vyšetřeno na přítomnost salmonel. Při použití konvenčních metod byla ve 33 vzorcích prokázána přítomnost salmonel (8 %), při použití metody IMS bylo zjištěno 49 pozitivních nálezů (12 %). Při vyšetřování klasickými metodami byl u vzorků sušeného mléka prokázán vyšší počet falešně negativních nálezů v porovnání s metodou IMS. Celkem bylo vyšetřeno 375 vzorků potravin (mléčné výrobky, syrové maso a masné výrobky) na přítomnost bakterií rodu *Listeria*; 81 vzorků (21,6 %) vyšetřených konvenčními metodami bylo pozitivních a 91 (24,3 %) bylo pozitivních použitím metody IMS. Výsledky ukazují, že metoda IMS byla minimálně stejně citlivá jako konvenční metody detekce, a to při úspoře alespoň jednoho dne, protože není třeba provádět krok selektivního pomnožení. Porovnáním klasických kultivačních technik a IMS byly prokázány statisticky významné rozdíly ve prospěch IMS.

Salmonella spp.; *Listeria* spp.; metody stanovení; imunomagnetická separace; potraviny

ÚVOD

Při rutinním mikrobiologickém vyšetřování potravin se při průkazu salmonel a listerií postupuje podle platných norem ČSN ISO 6579 a ČSN ISO 10560 (u masných výrobků metodou USDA). Úspěšnost záchytu sledovaných bakterií je při použití těchto konvenčních metod závislá na různých faktorech. Například při nízkém počtu sledovaných bakterií ve vzorku, při silné kontaminaci konkurenční mikroflórou a subletálními poškozením buněk vlivem technologického opracování či

za přítomnosti přirozených antimikrobiálních látek v potravinách se výtěžnost klasických kultivačních metod snižuje. V posledních letech se stále více uplatňují alternativní metody založené na imunologických a molekulárně genetických principech. Jejich výhody spočívají v úspoře času, vyšší citlivosti a specifitě. Technika imunomagnetické separace (IMS) je kombinací imunologické a klasické kultivační metody. Poskytuje současně výhody obou metod a dále umožňuje provedení sérotypizace, případně dalších konfirmačních testů. Princip této moderní alternativní metody spočívá ve

* Supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of Czech Republic (Project No. 3988-3).

vazbě bakterií na povrch superparamagnetických kuliček obalených specifickou protilátkou. Po 24hodinovém předpomnožení se ke vzorku přidají magnetické kuličky. Jsou-li sledované bakterie přítomné, naváží se a pomocí magnetu se vzniklý komplex odseparuje z pomnožovacího média. Po promytí v pufru se suspenze kultivuje na povrch selektivně diagnostického agarového média nebo se dále analyzuje metodou PCR či ELISA (Olsvik aj., 1994; Šafařík aj., 1995; Cudjoe aj., 1995).

Cílem této práce bylo ověření možnosti využití metody IMS při rutinním bakteriologickém vyšetřování potravin a srovnání výsledků s konvenčními kultivačními technikami.

MATERIÁL A METODA

Vzorky potravin

Celkem bylo analyzováno 783 vzorků potravin. Průkaz přítomnosti salmonel byl prováděn u 408 vzorků (sušené mléko, konzumní vejce skořápková a vejce sušená, různé druhy masa, ovoce a zelenina, koření a cukrářské výrobky). Přítomnost listerií byla monitorována u 375 vzorků (mléčné výrobky, různé druhy masa, masné výrobky a listová zelenina). Potraviný pocházel převážně z tržní sítě, z části byly odebírány v rámci běžného hygienického dozoru přímo u výrobců.

Metody detekce

Klasické kultivační techniky

Vzorky potravin byly souběžně vyšetřovány klasickými kultivačními technikami a IMS. Průkaz salmonel byl prováděn podle ČSN ISO 6579 na médiích RV a BGA (Rappaport Vassiliadis s vyočkováním na agar s brilantovou zelení) a SC a XLD (selenitová půda s cystinem s vyočkováním na xylóza lyzin dekarboxylázový agar). Suspektní kolonie ze selektivních agarů byly potvrzovány podle normy.

Průkaz listerií v mléčných, zeleninových a ovocných výrobcích byl prováděn podle ČSN ISO 10560 (FDA) na médiích BLEB (pufrovaná půda pro pomnožování listerií) s vyočkováním na OXFORD a PALCAM média. V masé a masných výrobcích byl průkaz listerií prováděn metodou USDA na médiích UVM I, UVM II (University Vermont Medium) s následným vyočkováním na OXFORD a PALCAM agar. Ke kultivaci byly použity živné půdy od firmy Oxoid, Velká Británie. Suspektní kolonie ze selektivních agarů byly potvrzovány podle normy, dále byly vyočkovány na chromogenní agar Rapid *L. mono* (Sanofi Diagnostics Pasteur, Francie), který umožňuje snadné a spolehlivé odlišení *L. monocytogenes* (LM) na základě průkazu aktivity fosfolipázy a neschopnosti utilizovat xylózu. Izolované LM byly sérotypizovány antiséry od firmy Denka Seiken, Japonsko.

Technika imunomagnetické separace

Pro IMS byly použity produkty Dynabeads® anti-Salmonella a Dynabeads® anti-Listeria (Dynal, Norsko). K 1 ml předpomnoženého vzorku bylo přidáno 20 µl příslušných magnetických kuliček, které byly po 15minutovém mírném promíchávání na třepačce odseparovány magnetem a jedenkrát promyty ve fosfátovém pufru s 0,05 % Tweenu 20. Kuličky byly resuspendovány v 50 µl pufru a vyočkovány na povrch selektivních agarů RAMBACH (Merck, Německo) pro salmonely a PALCAM (Oxoid) pro listerie.

Statistické zhodnocení

Statistická významnost zjištěných rozdílů mezi hodnotenými metodami byla analyzována McNemanovým znamínkovým testem (SPLUS, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, ČR).

VÝSLEDKY

Salmonella spp.

Metodou IMS bylo ve vyšetřovaných potravinách prokázáno 49 (12 %) pozitivních nálezů. Postupem podle ČSN ISO bylo na médiích RV s vyočkováním na BGA zjištěno 25 (6 %) pozitivních vzorků a kombinací médií SC a XLD agar bylo prokázáno 33 (8 %) pozitivních vzorků. U sušených výrobků (vejce a mléko) byla zachytitelnost metodou IMS výrazně vyšší (20 %) v porovnání s klasickou kultivační technikou (RV a BGA 1,7 % a SC a XLD 6,7 %). Podrobné výsledky podle jednotlivých kategorií potravin jsou uvedeny v tab. I. V analyzovaných vzorcích byly detekovány sérovary: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Montevideo* a *S. Newport*.

Listeria spp.

Při vyšetřování potravin a surovin metodou IMS byly listerie prokázány u 91 vzorku (24 %). Klasickými kultivačními technikami byly detekovány u 81 (22 %) vzorku. Podrobné výsledky podle je jednotlivých kategorií potravin jsou uvedeny v tab. II. Zastoupení jednotlivých druhů listerií podle četnosti bylo následující: *L. innocua* 57 %, *L. monocytogenes* 30 %, *L. welshimeri* 6 %, *L. seeligeri* 6 % a *L. ivanovii* 1 %. Většina izolovaných LM patřila k sérotypu 1/2, ojediněle byl registrován i sérotyp 4b.

DISKUSE

Pozitivní nálezy salmonel byly u námi vybraného souboru vzorků potravin nejvyšší u vajec (IMS 26 %, ČSN ISO 22 %), a to jednak sušených získaných přímo

I. Průkaz salmonel v potravinách metodou IMS a klasickou kultivační technikou – Demonstration of *Salmonella* spp. in foods by IMS technique and by conventional detection methods

Potravina ¹	Počet vyšetřených vzorků ¹³	Metoda detekce salmonel ¹⁴											
		IMS				ČSN ISO 6579							
		RAMBACH				RV – BGA				SC – XLD			
		pozitivní ¹⁵		negativní ¹⁶		pozitivní		negativní		pozitivní		negativní	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Vejce sušená ²	22	9	41	13	59	2	9	20	91	7	32	15	68
skořápková ³	55	11	20	44	80	9	16	46	84	10	18	45	82
Sušené mléko ⁴	97	15	15	82	85	0	0	97	100	1	1	96	99
Maso hovězí ⁵	36	0	0	36	100	0	0	36	100	0	0	36	100
vepřové ⁶	72	0	0	72	100	1	1	71	99	1	1	71	99
drůbeží ⁷	41	12	29	29	71	13	32	28	68	14	34	27	66
rybí ⁸	36	0	0	36	100	0	0	36	100	0	0	36	100
králíčí ⁹	12	0	0	12	100	0	0	12	100	0	0	12	100
Ovoce a zelenina ¹⁰	27	1	4	26	96	0	0	27	100	0	0	27	100
Ostatní potraviny ¹¹	10	1	10	9	90	1	10	9	90	1	10	9	90
Celkem ¹²	408	49	12	359	88	25	6	383	94	33	8	375	92

¹food, ²dried eggs, ³shell eggs, ⁴milk powder, ⁵meat – beef, ⁶pig, ⁷poultry, ⁸fish, ⁹rabbit, ¹⁰fruit and vegetables, ¹¹other foods, ¹²total, ¹³number of examined samples, ¹⁴method of *Salmonella* detection, ¹⁵positive, ¹⁶negative

II. Průkaz listerií v potravinách metodou IMS a klasickou kultivační technikou – Demonstration of *Listeria* spp. in foods by IMS technique and by conventional detection methods

Potravina ¹	Počet vyšetřených vzorků ¹²	Metoda detekce listerií ¹³											
		IMS				Klasická kultivační metoda ¹⁴							
		IMS				FDA (ČSN ISO 10560) (BLEB – PALCAM)				USDA (UVM I, II, PALCAM)			
		pozitivní ¹⁵		negativní ¹⁶		pozitivní		negativní		pozitivní		negativní	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Mléčné výrobky ²	62	6	10	56	90	5	8	57	92				
Sušené mléko ³	5	0	0	5	100	0	0	5	100				
Maso hovězí ⁴	36	21	58	15	42					21	58	15	42
vepřové ⁵	72	27	37	45	63					21	29	51	71
drůbeží ⁶	51	25	49	26	51					22	43	29	57
rybí ⁷	77	3	4	74	96					0	0	77	100
králíčí ⁸	12	0	0	12	100					0	0	12	100
Masné výrobky ⁹	36	5	14	31	86					7	19	29	81
Zelenina ¹⁰	24	4	17	20	83	5	21	19	79				
Celkem ¹¹	375	91	24	284	76	10	11	81	89	71	25	213	75

¹food, ²milk products, ³milk powder, ⁴meat – beef, ⁵pig, ⁶poultry, ⁷fish, ⁸rabbit, ⁹meat products, ¹⁰vegetables, ¹¹total, ¹²number of examined samples, ¹³method of *Listeria* detection, ¹⁴conventional detection method, ¹⁵positive, ¹⁶negative

od výrobců, jednak konzumních skořápkových zakoupených v tržní síti v letních měsících. U 126 vzorků masa hovězího, vepřového, králíčího a rybího z tržní sítě nebyla salmonela metodou IMS detekována v žádném případě a metodou ČSN ISO jednou. U masa drůbežího (kuřata a slepice) se pozitivita pohybovala mezi 29 až 34 % (podle použité detekční metody).

V souboru námi vyšetřovaných potravin byl pozitivní záchyt listerií potvrzen u téměř čtvrtiny vzorků. Nejvyšší počty pozitivních vzorků byly u syrového masa

(hovězí 58 %, drůbeží 49 %, vepřové 37 %), ale také ve 14% vařených masných výrobků (tlačenka, jitrnice, játrovka). U těchto komodit byl zjištěn výskyt LM.

Statisticky vysoce významný rozdíl byl zaznamenán při stanovení salmonel metodou IMS a konvenčními kultivačními technikami ($p = 0,01$). Při použití kombinace médií RV a BGA byla námi zjištěná citlivost pouhých 51 % v porovnání s IMS. Tento fakt může být způsoben vysokou selektivitou RV média s nízkým pH a relativně vysokou kultivační teplotou 42 °C.

Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán také při stanovení listerií, a to při porovnání metod IMS a USDA ($p = 0,05$). Rozdíly mezi metodami IMS a FDA nebyly statisticky významné.

Metoda imunomagnetické separace je vhodná pro detekci patogenů v širokém spektru potravin (Molla aj., 1994). Nejlépe se uplatňuje tam, kde dochází k subletálnímu poškození buněk (například sušené výrobky) a kde klasické metody nejsou vždy dostatečně citlivé (Dziadkowiec aj., 1995). Určitá omezení se však mohou vyskytnout při vyšetřování viskózních nebo velmi tučných potravin. V těchto případech je nutné upravit poměr vzorku a magnetických kuliček a také složení promývacího pufru přidáním Tweenu až na koncentraci 0,1 %.

Při analýze vzorku po 12 až 18hodinovém pomnožení v příslušných médiích dosahuje metoda IMS minimálně stejné, případně i vyšší citlivosti, než metoda klasická (Mansfield a Forsythe, 1996), což se projevilo i v našem případě při vyšetřování různých potravinových komodit. Současně se zkracuje doba nutná k vyšetření alespoň o jeden den. Protože dochází ke koncentraci sledovaných bakterií, je kontaminace sekundární mikroflórou po vyočkování na selektivní agary nižší a často umožňuje provést i rodové zařazení bez dalších subkulturací.

Zjištěné výsledky potvrzují, že metoda IMS je při průkazu přítomnosti salmonel a listerií v potravinách jednoduchou, účinnou a dostatečně citlivou alternativou standardních kultivačních technik.

LITERATURA

- Cudjoe K. S., Hagtveldt T., Dainty R. (1995): Immunomagnetic separation of Salmonella from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP) – ELISA. *Int. J. Food Microbiol.*, 27, 11–25.
- Dziadkowiec D., Mansfield L. P., Forsythe S. J. (1995): The detection of Salmonella in skimmed milk powder enrichments using conventional methods and immunomagnetic separation. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20, 361–364.
- Mansfield D. P., Forsythe S. J. (1996): Collaborative ring trial of Dynabeads® anti-Salmonella for immunomagnetic separation of stressed Salmonella cells from herbs and spices. *Int. J. Food Microbiol.*, 29, 41–47.
- Molla B., Kleer J., Sinell H. J. (1994): Detection of Salmonella in foods by immunomagnetic separation. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 45, 110–113.
- Olsvik O., Popovič T., Skjerve E., Cudjoe K., Hornes E., Ugelstad J., Uhlen M. (1994): Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 7, 43–54.
- Safařík I., Safaříková M., Forsythe S. J. (1995): The application of magnetic separations in applied microbiology. *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 575–585.

Received: 99-03-23

Accepted: 99-05-04

Kontaktní adresa:

MVDr. Renata Karpíšková, Státní zdravotní ústav v Praze, Centrum hygieny potravinových řetězců, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 75 57 45, fax +420 5 41 21 17 64, e-mail: niph@chpr.anet.cz

THE INTERACTION OF TWO FORMS OF GLUTAMIC ACID WITH AMMONIA IN SHEEP*

INTERAKCIA DVOCH FORIEM KYSELINY GLUTÁMOVEJ S AMONIAKOM U OVIEC

V. Šutiak¹, I. Šutiaková², I. Rosival¹

¹Department of Pharmacology, University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

²Laboratory of Genetics, Research Institute of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: In our experiments, 20 Slovak Merino sheep 36.5 ± 4.0 kg b.w., aged 3.5 years were used. They were starved 12 h before the experiment and for 6 h after the initial administrations of the agents. Sheep had free access to water throughout the period. Control sheep received in addition to urea (0.5 g/kg b.w.), an equimolar quantity of 15% nonbuffered glutamic acid solution and the experimental sheep received the same quantity of sodium hydroxide buffered glutamic acid solution. The laboratory indices demonstrated that nonbuffered glutamic acid in contrast to sodium hydroxide buffered glutamic acid was able to protect sheep from ammonia intoxication induced via *p.o.* administration of urea (see Tab. I). The experiments demonstrated a significant trend towards higher concentrations of ammonia ($P < 0.01$) and lower values of pH ($P < 0.01$) in the rumen fluid and lower concentrations of ammonia in the blood ($P < 0.01$) of sheep with nonbuffered glutamic acid in contrast to sodium hydroxide buffered glutamic acid, especially 60 min and more after the administration of agents. We did not however register any significant differences in the dynamics of urea concentrations between both groups of sheep in blood plasma throughout the period of experiments ($P < 0.05$). Clinical observations of animals demonstrated that sodium hydroxide buffered glutamic acid was not able to protect sheep satisfactorily against ammonia intoxication. Sheep in this group showed some intoxication symptoms and one died, in contrast to sheep in the control group with nonbuffered glutamic acid.

urea; ammonia; toxicity; sheep; glutamic acid; buffered glutamic acid; pH value; prevention; interaction

ABSTRAKT: Cieľom práce bolo overiť či má aj pufrovaná kyselina glutámová s hydroxidom sodným (glu-Na) rovnaké ochranné pôsobenie proti močovinatej a amoniakálnej otrave oviec ako nepufrovaná kyselina glutámová (glu). Pre neutralizáciu bol použitý roztok hydroxidu sodného v takom množstve, aby glu-Na dosiahla hodnotu pH 7,0. Pokusy sme urobili na 20 ovciach plemena Slovenské merino, ktoré hladovali pred pokusmi 12 hodín. Ovce mali ž. hm. $36,5 \pm 4,0$ kg a vek 3,5 roka. Kontrolnej skupine oviec sme podávali sondou *p. o.* 0,5 g 17% močoviny na kg ž. hm. spolu s ekvimolárnym množstvom 15% glu. Kvantita aminokyseliny bola vypočítaná na amoniak, ktorý vznikne kompletnou hydrolyzou močoviny. Pokusnej skupine oviec sme podali podobné množstvá oboch látok, len s tým rozdielom, že sme im dávali glu-Na. Merania pH hodnoty bachorovej šťavy sme robili potenciometricky pH metrom fy Radelkis Budapešť, typ OP-264, a koncentráciu amoniaku spektrofotometricky využívajúc Nesslerovo činidlo. Obsah močoviny v krvnej plazme bol stanovený ureázovou metódou v kombinácii s mikrodifúziou, ktorá bola použitá i pre stanovenie amoniaku v bachorovej šťave. Výsledky pokusov ukázali, že i keď sa kyselina glutámová podieľala v oboch formách na biochemicko-metabolickej detoxikácii amoniaku, významnejší vplyv mala na pôsobenie čpavku najmä jej fyzikálno-chemická zložka. Neneutralizovaná glu na rozdiel od neutralizovanej glu-Na intenzívnejšie ionizovala amoniak na amoniový ión a tým významne bránila jeho absorpciu z bachora do krvi, čím interakčne zabránila i jeho toxickým prejavom u oviec. Nasvedčujú tomu laboratórne nálezy, ale aj klinické správanie sa oviec.

močovina; amoniak; toxicita; ovce; kyselina glutámová; glutamán sodný; hodnota pH; prevencia; interakcia

* Supported by Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and Slovak Academy of Sciences (Grant No. 1/5150/98).

I. The effect of equimolar doses of two glutamic acid forms^(1,2) on the changes in ammonia and pH value on the rumen fluid and on blood ammonia, and on the blood plasma urea of sheep in experiments with urea

Type of experiments	Statistical data ⁽³⁾	Time of experiments (min)								
		before administration after administration of agents								
		-10	30	60	90	120	180	240	300	360
concentration of ammonia in the rumen fluid (mmols/l)										
U + glu-Na <i>n</i> = 10	$\bar{x}^{(4)}$	8.4 ⁽⁵⁾	39.3	46.2	52.9	45.3	39.6	35.3	33.5	30.6
	$\pm \sigma$	3.0	9.3	8.1	5.6	7.5	8.9	8.3	6.1	6.3
	<i>P</i> ₁	—	c	c	c	c	c	c	c	c
U + glu <i>n</i> = 10	$\bar{x}$	7.6 ⁽⁵⁾	57.6	74.0	81.5	83.6	76.6	74.2	66.9	65.2
	$\pm \sigma$	1.8	19.4	19.8	21.9	24.2	19.0	17.4	14.4	15.0
	<i>P</i> ₁	—	c	c	c	c	c	c	c	c
	<i>P</i> ₂	o	a	c	c	c	c	c	c	c
pH values of rumen fluid (logmol C)										
U + glu-Na <i>n</i> = 10	$\bar{x}^{(4)}$	7.0 ⁽⁵⁾	7.5	7.6	7.7	7.7	7.6	7.5	7.2	7.2
	$\pm \sigma$	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3
	<i>P</i> ₁	—	c	c	c	c	c	c	o	o
U + glu <i>n</i> = 10	$\bar{x}$	6.6 ⁽⁵⁾	5.9	6.2	6.4	6.5	6.6	6.6	6.6	6.5
	$\pm \sigma$	0.4	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3
	<i>P</i> ₁	—	c	a	o	o	o	o	o	o
	<i>P</i> ₂	a	c	c	c	c	c	c	c	c
concentration of ammonia in blood (mmols/l)										
U + glu-Na <i>n</i> = 10	$\bar{x}^{(4)}$	0.08 ⁽⁵⁾	0.22	0.25	0.29	0.26	0.23	0.22	0.19	0.14
	$\pm \sigma$	0.01	0.14	0.05	0.10	0.09	0.08	0.10	0.09	0.06
	<i>P</i> ₁	—	c	c	c	c	c	c	c	c
U + glu <i>n</i> = 10	$\bar{x}$	0.11 ⁽⁵⁾	0.13	0.15	0.16	0.15	0.14	0.13	0.12	0.11
	$\pm \sigma$	0.04	0.03	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.05	0.04
	<i>P</i> ₁	—	o	a	a	o	o	o	o	o
	<i>P</i> ₂	o	a	c	c	c	c	a	o	o
concentration of urea in blood plasma (mmols/l)										
U + glu-Na <i>n</i> = 10	$\bar{x}^{(4)}$	5.62 ⁽⁵⁾	6.19	6.87	7.37	8.01	8.87	9.40	9.83	9.94
	$\pm \sigma$	1.07	0.90	1.14	1.17	1.35	1.35	1.07	1.32	1.57
	<i>P</i> ₁	—	o	a	c	c	c	c	c	c
U + glu <i>n</i> = 10	$\bar{x}$	5.13 ⁽⁵⁾	5.80	6.62	7.10	7.33	7.84	8.44	8.65	8.76
	$\pm \sigma$	1.67	1.46	1.78	1.67	1.71	1.85	1.92	1.82	1.60
	<i>P</i> ₁	—	o	o	a	a	c	c	c	c
	<i>P</i> ₂	o	o	o	o	o	o	o	o	o

Comments:

- (1) = The equimolar quantity of non-buffered glutamic acid (glu) was calculated to ammonia which may be released from urea after complete hydrolysis.
- (2) = The buffered glutamic acid (glu-Na) was prepared by neutralization with sodium hydroxide solution to pH 7.0 and for calculation see point⁽¹⁾.
- (3) = In each experiment, there were 10 animals.
- (4) = The referential values used for statistical evaluation of the significance of the results after comparing between glu-Na and glu values at the same time.
- (5) = The referential value used for statistical evaluation of the significance of the results after comparing between -10 min value and to selected time inside the group.

U = urea was administered to every sheep in quantity 0.5 g of 17% solution/kg b.w. perorally

o = the nonsignificance i.e. $P > 0.05$

a = $P < 0.05$

c = $P < 0.01$

— = referential value

$\bar{x}$ = mean values

$\pm \sigma$ = standard deviation

P_1 = the statistical significance of results inside a comparing group, when referred to data at -10 min

P_2 = the statistical significance of results after comparing and referring the results at the same time between groups glu-Na and glu

INTRODUCTION

It is well known from the literature that ammonia may be transformed via several enzymatic reactions into genetically dangerous and toxic agents in bionature (Yamafuji et al., 1960; Yamafuji and Osajima, 1961; Yamafuji, 1965). All these agents may induce very serious organic damage (Walsche, 1953; Webster and Davidson, 1956; Watanabe et al., 1969; Višňovský, 1998) and in the cases of high ammonia concentrations death (Šutiak and Šutiaková, 1980, 1988a; Bačo, 1998).

These serious effects (Gustin et al., 1994; Urbain et al., 1994, 1998) are reasons why physicians, veterinarians, and some other professionals are very worried about ammonia, especially after exposure of animals and humans to its high doses. Glutamic acid is one of the principal metabolites which take part not only in ammonia metabolism, but also in the physico-chemical balance of metabolites in various animal species (Devlin, 1992; Ulrich, 1994; Stryer, 1996).

The purpose of the article was to verify the protective effect of two forms of glutamic acid against ammonia intoxication in sheep, induced by urea.

MATERIAL AND METHODS

In our experiments we used 20 Slovak Merino sheep 36.5 ± 4.0 kg b.w., aged 3.5 years. Twelve hours before the experiments and also during the experiments all the sheep starved, but they had free access to water. The experiments were carried out with 2 groups, one control (glu) and one experimental (glu-Na) with 10 sheep in each. Every sheep in either of the 2 groups has been treated orally with 0.5 g of 17% solution of urea/kg b.w. Moreover each sheep in the first control group received in addition to urea an equimolar quantity 15% glu. The precise quantity of non-buffered glutamic acid and glu-Na had been calculated according to ammonia which may be released from urea after its complete hydrolysis. Furthermore, the second experimental group of sheep also received orally apart from urea an equimolar quantity of glutamic acid buffered with sodium hydroxide solution to pH 7.0 similarly to the above.

The concentration of ammonia in rumen fluid and in blood, as well as the pH value of rumen fluid and urea in blood plasma have been determined in accordance with methods and conditions described elsewhere (Šutiak and Šutiaková, 1988a, b). The measurements of the pH value of rumen fluid were conducted with a pH meter (Radelkis, Budapest) using the type OP-264. The determine blood ammonia concentration a spectrophotometric procedure was used with Nessler's reagent. The content of blood plasma urea was measured by the urease procedure in combination with microdiffusion, and it was also used to determine the ammonia in rumen fluid. The evaluation of the statistical significance of these results has been conducted according to the procedure described by Poláček (1996).

RESULTS AND DISCUSSION

Initial levels of the metabolites observed and pH values agree well with the data published earlier (Šutiak et al., 1981; Šutiak and Šutiaková, 1988a, b).

The pharmacological indices of the effect of two glu forms on rumen fluid and on blood are given in Tab. I. The overall view of the results obtained demonstrates that glu takes part in the detoxification of ammonia in sheep. It is not surprising because glu is quickly assimilated by an animal's metabolism (Egan and Black, 1968; Lehninger et al., 1993; Holum, 1998). Although glu-Na may act quickly in the ammonia metabolism too, it was not able to effectually prevent sheep from an increase of pH value in the rumen fluid, and from hyperammonaemia. In the experimental group with a combination of urea and glu-Na, one sheep died. In the poisoned sheep, we observed somnolence and tremor at the beginning, and later on lying down, hypersalivation, trism, hyperventilation, tachycardia, tonic-clonic convulsions and finally death. The occurrence of the clinical symptoms in poisoned animals agreed well with the data given by Bartík (1991).

In contrast to the situation described above in the control group of sheep with combination of glu and urea we registered lower pH value of rumen fluid, lower concentration of ammonia in blood and the absence of ammonia toxicity symptoms in all members of this group. This response was very similar to our earlier results observed in experiments with acetic, propionic, citric, and orthophosphoric acids (Šutiak et al., 1981; Šutiak and Šutiaková, 1988a). We can explain this highly preventive effect of glu except by detoxification via metabolism and also by the decrease in the pH value of rumen fluid and by the concomitant ionization of ammonia to ammonium hydroxide in accordance with the information of Warren and Nathan (1958), Warren and Schenker (1963), Šutiaková and Šutiak (1988b), and Bartík (1991). After ionization and the transformation of ammonia to ammonium, the former cannot penetrate from rumen to blood. That is why we observed a higher concentration of ammonia in rumen fluid and its lower concentration in blood in the case of glu group of sheep compared with the glu-Na experiments.

Acknowledgements

The authors are grateful to the departmental staff for the technical assistance.

REFERENCES

- Bačo V. (1998): Death of fishes has far-reaching consequences. *Lúč*, 25, 5-6.
- Bartík M. (1991): Urea Toxicity. In: Augustinský V., Bajová V., Balaščák J., Balun J. and others (eds.): *Veterinary Vade-mecum*. Bratislava, Príroda. 864-865.
- Devlin T. M. (1992): *Biochemistry with Clinical Correlations*. 3rd. ed., New York, J. Wiley and Sons Inc. 606 pp.

- Egan A. R., Black A. L. (1968): Glutamic acid metabolism in the lactating dairy cow. *J. Nutr.*, 96, 450-453.
- Gustin P., Urbain P., Prouvost J. F., Ansay M. (1994): Impact de l'Ammoniac sur le Système Respiratoire du Porc. *J. Rech. Porc. France*, 26, 79-84.
- Holm J. R. (1998): Fundamentals of General, Organic and Biological Chemistry. 6th ed. New York, J. Wiley and Sons Inc. 779 pp.
- Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. (1993): Principles of Biochemistry. 2nd ed. New York, Worth Publishers. 899 pp.
- Poláček M. (1996): Biomathematics for Veterinarians. Košice, Datahelp. 256 pp.
- Stryer L. (1996): Biochemistry. 4th ed. New York, W. H. Freeman and Co. 730 pp.
- Šutiak V., Šutiaková I. (1980): Mass utilization of urea and other non-protein nitrogenous substances in animal nutrition. *Proc. St. Vet. Admin. MASR*, 7, 137-148.
- Šutiak V., Šutiaková I. (1988a): Testing the effectiveness of the combined administration of glutamic and citric acids in relation to lethal effects of urea and ammonia in sheep. *Veter. Med. (Praha)*, 33, 411-420.
- Šutiak V., Šutiaková I. (1988b): Tolerance of extreme urea doses in different rations with orthophosphoric acid in sheep. *Agrochemistry*, 28, 151-155.
- Šutiak V., Melter J., Michalides J., Szabóová E., Andrejková V. (1981): Comparative study of the protective efficacy of three carboxylic acids against the toxicity of ammonia and urea in sheep. *Veter. Med. (Praha)*, 26, 223-232.
- Urbain B., Gustin P., Prouvost J. F., Ansay M. (1994): Quantitative assesment of aerial ammonia toxicity to the nasal mucosa by use of the nasal lavage method in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 55, 1335-1340.
- Urbain B., Mast J., Goddeeris B., Ansay M., Gustin P. (1998): Influence d'un exposition aux poussières sur l'appareil respiratoire du porc, interaction avec l'ammoniac. *J. Rech. Porc. France*, 30, 417-422.
- Urich K. (1994): Comparative Animal Chemistry. Berlin Springer-Verlag, 728 pp.
- Višňovský P. (1998): A Pharmacology Pocket Book. Prague, Jessenius-Maxdorf. 349 pp.
- Walsche J. M. (1953): The effect of glutamic acid on the coma of hepatic failure. *Lancet*, 1, 1075-1076.
- Warren K. S., Nathan D. G. (1958): The passage of ammonia across the blood-brain-barrier and its relation to blood. *H. J. Clin. Invest.*, 37, 124-126.
- Warren K. S., Schenker S. (1963): Differential effect of fixed acid and carbodioxide on ammonia toxicity. *Am. J. Physiol.*, 203, 903-905.
- Watanabe T., Tanazaki N., Oayama A. (1969): Significance of myocardial ammonia metabolism in the failing heart. *Israel J. Med. Sci.*, 5, 496-497.
- Webster L. T., Davidson Ch. S. (1956): The effect of sodium glutamate on hepatic coma. *J. Clin. Invest.*, 35, 191-195.
- Yamafuji K. (1965): Metabolic virogens having mutagenic action and chromosomal previruses. *Enzymol.*, 27, 217-220.
- Yamafuji K., Osajima Y. (1961): Specificity of ammonia-hydroxylamine-hyponitrite or nitrite dehydrogenase and determination of intermediates in the inorganic nitrogen cycle. *Enzymol.*, 22, 344-346.
- Yamafuji K., Osajima Y., Omura H., Hatano S. (1960): Enzymatic cycle between ammonia and nitrate. *Enzymol.*, 21, 245-247.

Received: 99-02-16

Accepted after corrections: 99-05-05

Contact Address:

Doc. MVDr. Václav Šutiak, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. +421 95 633 21 11-13, e-mail: sutiak@uvm.sk

INSERTION SEQUENCES OF MYCOBACTERIA AND THEIR USE
IN THE STUDY OF EPIDEMIOLOGY OF MYCOBACTERIAL
INFECTIONS*INZERČNÍ SEKVENCE U MYKOBAKTERIÍ A JEJICH VYUŽITÍ PŘI
STUDIU EPIDEMIOLOGIE MYKOBAKTERIÁLNÍCH INFEKČÍL. Dvorská¹, M. Havelková², M. Bartoš³, J. Bartl¹, I. Pavlík¹¹Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic²State Health Institute, Prague, Czech Republic³Biovendor-Laboratory Medicine, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: The current studies on human and veterinary epidemiology have highly contributed to the detection of specific, small and mobile elements of the DNA – insertion sequences (IS). These sequences were: IS900 in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, IS6110 in *M. tuberculosis*, and IS901 in *M. avium* complex. It has been ten years since the discovery of mycobacterial insertion sequences. Accordingly, the aim of this abstract was to present a summary of various research aspects and utilization of insertion sequences in mycobacteriology. The discovery, composition and function of IS are described in the introduction part. Priority has been given to the insertion sequences found in *M. avium* complex: IS902, IS1245, IS1311, IS1110, IS1141, IS1613; in *M. tuberculosis*: IS1081; and in some opportunistic pathogenic mycobacteria (*M. smegmatis*, *M. kansasii* and *M. fortuitum*). The last section of the article deals with the use of insertion sequences in epidemiological and epizootological studies of mycobacterial infections caused by *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. a. paratuberculosis*, and *M. avium* complex.

mycobacteria; insertion sequence; DNA-typing; epidemiology

ABSTRAKT: Studium humánní a veterinární epidemiologie značným způsobem ovlivnil objev specifických inzerčních sekvencí (IS), což jsou malé, mobilní elementy DNA. U mykobakterií to byly zvláště IS900 u *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, IS6110 u *M. tuberculosis* a IS901 u kmenů komplexu *M. avium*. Od objevení první mykobakteriální inzerční sekvence uplynulo více než 10 let. Článek shrnuje různé aspekty výzkumu a využití inzerčních sekvencí v mykobakteriologii. V úvodní části je popisován objev, stavba a jejich funkce. V dalších kapitolách jsou kromě výše uvedených inzerčních sekvencí blíže charakterizovány především ty, které se vyskytují u kmenů komplexu *M. avium* IS902, IS1245, IS1311, IS1110, IS1141 a IS1613, u kmenů komplexu *M. tuberculosis* IS1081 a konečně inzerční sekvence některých podmíně patogenních mykobakterií (*M. smegmatis*, *M. kansasii* a *M. fortuitum*). V poslední části článku je shrnuto využití inzerčních sekvencí při studiu epidemiologie a epizootologie mykobakteriálních infekcí způsobovaných *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. a. paratuberculosis* a mykobakteriemi komplexu *M. avium*.

mykobakterie; inzerční sekvence; DNA-typizace; epidemiologie

CONTENTS

1. Introduction (Dvorská)
2. General characteristics of IS (Dvorská)
 - 2.1. Composition of IS elements
 - 2.2. Function of IS

* Supported by the National Agency for Agricultural Research in Prague (Grants No. EP 0960006087 and EP 7172/97) and the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (Grant No. 42113/97).

3. Insertion sequences of *M. avium* complex (Dvorská, Pavlík)
 - 3.1. *IS900* in *M. a. paratuberculosis*
 - 3.2. *IS* in *M. avium* complex (Dvorská, Pavlík)
 - 3.2.1. Precise characteristics of *IS901* and *IS902*
 - 3.2.1.1. Relationship between *IS901* and the serotypes of *M. avium* komplex
 - 3.2.1.2. Correlation between the presence of *IS901* and the virulence for birds
 - 3.2.2. Characteristics of *IS1245*
 - 3.2.2.1. The advantage of *IS1245* in epidemiology
 - 3.2.2.2. Relationship between *IS1245* and the serotypes of *M. avium* complex
 - 3.2.3. Characteristics of *IS1311*
 - 3.2.4. *IS1110* in *M. avium* complex
 - 3.2.5. Characteristics of *IS1613*
 - 3.2.6. Characteristics of *IS1141*
 - 3.3. *IS* in the strains of *M. tuberculosis* (Havelková, Bartoš, Dvorská)
 - 3.3.1. *IS6110* in the strains of *M. tuberculosis*
 - 3.3.2. Characteristics of *IS1081* in *M. bovis*
 - 3.4. Other *IS* in the remaining species of mycobacteria (Dvorská)
 - 3.4.1. *IS* in *M. smegmatis*
 - 3.4.2. *IS1652* in *M. kansasii*
 - 3.4.3. *IS6100* in *M. fortuitum*
4. Application of *IS* in the epidemiological and epizootological studies of mycobacterial infections (Havelková, Bartoš, Pavlík, Dvorská)
 - 4.1. Use of *IS6110* in molecular epidemiology of *M. tuberculosis* (Havelková, Bartoš)
 - 4.1.1. Utilization of *IS6110* in the epidemiology of tuberculosis
 - 4.1.1.1. Study of the reactivation of tuberculosis
 - 4.1.1.2. Research into the spread of *M. tuberculosis* in human population
 - 4.1.2. Survey of the transmission, spread and circulation of *M. tuberculosis* in the Czech Republic
 - 4.1.2.1. Study of the prevalence of the disease
 - 4.1.2.2. Analysis of suspected microepidemics
 - 4.1.3. Other uses of *IS6110* in the complex of *M. tuberculosis*
 - 4.2. Molecular epidemiology of *M. bovis* (Dvorská)
 - 4.2.1. Utilization of RFLP with different probes
 - 4.2.2. Relationship between a definite DNA type of *M. bovis* and the host
 - 4.3. Molecular epidemiology of *M. a. paratuberculosis* (Pavlík)
 - 4.3.1. Application of various restriction endonucleases
 - 4.3.2. Proposal for the standardization of methods
 - 4.3.3. Molecular epizootology of paratuberculosis in the Czech Republic and the Slovak Republic
 - 4.3.4. Study of the spread of the disease among ruminants
 - 4.3.5. Molecular epidemiology of strains isolated from infected imported ruminants and autochthons
 - 4.3.6. Molecular epidemiology of sheep
 - 4.3.7. Molecular epidemiology of wild ruminants
 - 4.3.8. Identification of *M. a. paratuberculosis* strains from patients with Crohn's disease
 - 4.4. Molecular epidemiology of *M. avium* complex (Dvorská, Pavlík, Bartl)
 - 4.4.1. RFLP of *M. avium* complex with *IS901*
 - 4.4.1.1. Use of *IS901* in the study of epizootology and epidemiology
 - 4.4.1.2. RFLP analysis of various serotypes
 - 4.4.1.3. RFLP examination of field strains
 - 4.4.2. RFLP of *M. avium* complex with *IS1245*
 - 4.4.3. PCR with the primers derived from *IS1110*
5. Conclusion (Dvorská)

OBSAH

1. Úvod (Dvorská)
2. Objev a obecná charakteristika *IS* (Dvorská)
 - 2.1. Stavba *IS* elementů
 - 2.2. Funkce *IS*
3. Mykobakteriální *IS* (Dvorská, Pavlík)
 - 3.1. *IS900* u *M. a. paratuberculosis*

- 3.2. *IS* u kmenů komplexu *M. avium* (Dvorská, Pavlík)
 - 3.2.1. Bližší charakteristika *IS901* a *IS902*
 - 3.2.1.1. Vztah mezi *IS901* a sérotypy komplexu *M. avium*
 - 3.2.1.2. Korelace mezi přítomností *IS901* a virulencí kmenů pro ptáky
 - 3.2.2. Bližší charakteristika *IS1245*
 - 3.2.2.1. Vhodnost *IS1245* pro epidemiologické studie
 - 3.2.2.2. Vztah mezi *IS1245* a sérotypy komplexu *M. avium*
 - 3.2.3. Charakteristika *IS1311*
 - 3.2.4. *IS1110* u kmenů komplexu *M. avium*
 - 3.2.5. Charakteristika *IS1613*
 - 3.2.6. Charakteristika *IS1141*
- 3.3. *IS* u kmenů komplexu *M. tuberculosis* (Havelková, Bartoš, Dvorská)
 - 3.3.1. *IS6110* u kmenů komplexu *M. tuberculosis*
 - 3.3.2. Charakteristika *IS1081* u *M. bovis*
- 3.4. Ostatní *IS* u jiných druhů mykobakterií (Dvorská)
 - 3.4.1. *IS* u *M. smegmatis*
 - 3.4.2. *IS1652* u *M. kansasii*
 - 3.4.3. *IS6100* u *M. fortuitum*
4. Využití *IS* při studiu epidemiologie a epizootologie mykobakteriálních infekcí (Havelková, Bartoš, Pavlík, Dvorská)
 - 4.1. *IS6110* v molekulární epidemiologii *M. tuberculosis* (Havelková, Bartoš)
 - 4.1.1. Možnosti praktického využití *IS6110* v epidemiologii bacilární tuberkulózy
 - 4.1.1.1. Studium reaktivace tuberkulózy
 - 4.1.1.2. Studium šíření *M. tuberculosis* v lidské populaci
 - 4.1.2. Studium přenosu, šíření a cirkulace kmenů *M. tuberculosis* v České republice
 - 4.1.2.1. Prevalenční studie
 - 4.1.2.2. Analýza suspektních mikroepidemií
 - 4.1.3. Další využití *IS6110* v komplexu *M. tuberculosis*
 - 4.2. Molekulární epidemiologie *M. bovis* (Dvorská)
 - 4.2.1. Využití metody RFLP s různými sondami
 - 4.2.2. Vztah určitého DNA typu kmene *M. bovis* k hostiteli
 - 4.3. Molekulární epidemiologie u kmenů *M. a. paratuberculosis* (Pavlík)
 - 4.3.1. Používání různých restrikčních endonukleáz
 - 4.3.2. Návrh standardizace metody
 - 4.3.3. Molekulární epizootologie paratuberkulózy v České republice a Slovenské republice
 - 4.3.4. Studium šíření nákazy uvnitř stáda přežvýkavců
 - 4.3.5. Molekulární epidemiologie kmenů izolovaných od infikovaných importovaných a původně chovaných přežvýkavců
 - 4.3.6. Molekulární epidemiologie v chovu ovcí
 - 4.3.7. Molekulární epidemiologie u divokých přežvýkavců
 - 4.3.8. Identifikace kmenů *M. a. paratuberculosis* od pacientů s Crohnovou chorobou
 - 4.4. Molekulární epidemiologie u kmenů komplexu *M. avium* (Dvorská, Pavlík, Bartl)
 - 4.4.1. RFLP u kmenů komplexu *M. avium* s *IS901*
 - 4.4.1.1. Využití *IS901* při studiu epizootologie a epidemiologie
 - 4.4.1.2. RFLP analýza sérotypových kmenů
 - 4.4.1.3. RFLP analýza terénních kmenů
 - 4.4.2. RFLP u kmenů komplexu *M. avium* s *IS1245*
 - 4.4.3. PCR s primery odvozenými od *IS1110*
5. Závěr (Dvorská)

Seznam použitých zkratk:

- IS* – insertion sequence (inzerční sekvence)
 DNA – deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
 ORF – Open Reading Frame (otevřený čtecí rámec)
 FR – Flanking Region (přilehlá oblast)
 RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)
 REA – Restriction Endonuclease Analysis (analýza štěpením restrikčními endonukleázami)
 PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis (pulzní gelová elektroforéza)

- bp – base pair (páry bazí)
 DR – direct repeat (přímá repetitivní sekvence)
 PGRS – polymorphic GC-rich repeat sequence (polymorfni repetitivní sekvence bohatá na GC nukleotidové báze)
 MPTR – major polymorphic tandem repeat (významná polymorfni tandemová repetice)
 RE – restriction endonuclease (restrikční endonukleáza)
 PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

1. ÚVOD

Za posledních více než sto let byly důkladně prostudovány metody klasické mikrobiologie určené pro bližší identifikaci jednotlivých původců různých bakteriálních infekcí. Od objevu struktury DNA 2. dubna 1953 biologem Watsonem a fyzikem Crickem (Watson a Crick, 1953) se všeobecně začaly používat metody analýzy DNA. Nejinak tomu bylo i v oboru mykobakteriologie. V současné době jsou pro bližší identifikaci a typizaci mykobakteriálních kmenů jednoho druhu k dispozici různé metodiky studující DNA. Podrobně o nich pojednává přehledný článek autorů Rychlíka a Pavlíka (1997).

Součástí DNA většiny organismů jsou malé mobilní genetické elementy obsahující pouze geny související s inzerčními funkcemi. Byly označeny jako inzerční sekvence (IS). Jejich vložení do strukturních genů způsobuje inzerční mutace.

V posledních několika letech značně stoupl zájem o výzkum IS z mnoha důvodů. Jedním z nejvýznamnějších je jejich využití při studiu epidemiologie většiny závažných infekčních onemocnění. Řada přehledných článků o IS popisuje jejich stavbu, funkci a využití u různých původců onemocnění (Green aj., 1989; Collins, 1991; van Embden aj., 1993). Ve studiu mykobakteriálních infekcí přinesl zásadní zlom objev první mykobakteriální inzerční sekvence IS900 u *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Green aj., 1989). V následujícím období se začalo využívat studia polohy a počtu kopií těchto IS v molekulární epidemiologii jednotlivých významných mykobakteriálních druhů.

Cílem tohoto článku je seznámit čtenáře se strukturou, funkcí, výskytem a využíváním inzerčních sekvencí (IS) při studiu humánní a veterinární epidemiologie významných mykobakteriálních druhů.

2. OBJEV A OBECNÁ CHARAKTERISTIKA IS

Inzerční sekvence byly poprvé detekovány v polovině 60. let jako původci silné „polární mutace“ v *lac* a *gal* operonech *Escherichia coli* K12 (Saedler a Starlinger, 1967). V průběhu dalších let bylo identifikováno a charakterizováno mnoho dalších IS, přičemž do roku 1998, jak uvádí Mahillon a Chandler (1998), jich bylo u mykobakterií celkem popsáno 28 (tab. I). Další informace týkající se IS je možné získat v mezinárodní databázi sekvencí IS <http://pc4.sisc.ucl.ac.be/is.html>.

2.1. Stavba IS elementů

Při studiu stavby IS byly zjištěny tyto charakteristické vlastnosti:

IS jsou relativně malé genomové elementy, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 0,7 do 2,5 kbp.

V genomu mnoha druhů bakterií se nacházejí v počtu kopií od jedné do několika set.

Obsahují často kromě jednoho hlavního otevřeného čtecího rámce (open reading frame – ORF), který kóduje enzym transponázu, více než dva vedlejší ORF.

Typické IS jsou na koncích ohraničeny obrácenými repetitivy (10 až 40 bp), ke kterým se váží přiléhající oblasti (flanking regions – FR).

Na základě struktury jsou IS rozděleny na typické (klasické) IS s obrácenými koncovými repetitivy a atypické IS, které nemají obrácené koncové repetice. V tab. II jsou na základě struktury stručně charakterizovány významné mykobakteriální IS vyskytující se u druhů *M. tuberculosis*, *M. a. paratuberculosis* a *M. avium* komplex, které mohou být využívány v epidemiologii mykobakterií. V tab. III jsou uvedeny některé další IS u vybraných druhů podmíněně patogenních mykobakterií.

I. Přehled dosud popsáných IS u rodu *Mycobacterium* (Mahillon a Chandler, 1998) – A summary of IS described until now in the genus *Mycobacterium* (Mahillon and Chandler, 1998)

Mykobakteriální komplex/druh/poddruh ¹	Inzerční sekvence ²
<i>M. tuberculosis</i> komplex	IS6110, IS986, IS987, IS1081, IS1547, ISM1, ISM2, ISM3
<i>M. avium</i> komplex	IS900, IS901, IS902, IS1245, IS1311, IS1110, IS1141, IS1613
<i>M. smegmatis</i>	IS1137, IS1549, IS6120, IS1096
<i>M. branderi</i>	IS1408
<i>M. goodii</i>	IS1511, IS1512
<i>M. fortuitum</i>	IS6110
<i>M. celatum</i>	IS1407
<i>M. xenopi</i>	IS1395
<i>M. kansasii</i>	IS1652, ISM4

¹ mycobacterial complex/species/subspecies, ² insertion sequence

II. Charakteristika významných mykobakteriálních IS u druhů komplexu *M. tuberculosis*, *M. avium* komplex a *M. a. paratuberculosis* – Description of important mycobacterial IS in the species of *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex and *M. a. paratuberculosis*

IS	Délka ¹ (bp)	Počet kopií ²	Původ ³ IS	Charakteristika ⁴	Citace ⁵
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> komplex					
IS6110*	1 355	0–25	<i>M. tuberculosis</i>	klasická IS příbuzná IS3** třídy enterobakterií ⁶ , GenBank X17348	Thierry aj. (1990)
IS986*	1 358	0–25	<i>M. tuberculosis</i>	klasická IS příbuzná IS3 třídy enterobakterií, GenBank X52471	McAdam aj. (1990)
IS987*	1 355	0–25	<i>M. bovis</i> BCG	klasická IS příbuzná IS3 třídy enterobakterií, GenBank X57835	Hermans aj. (1991)
IS1547	3 627	?	<i>M. tuberculosis</i>	GenBank Y16254	Fang aj. (1999)
IS1081	1 324	5–7	<i>M. bovis</i>	klasická IS příbuzná ⁷ IS256*** <i>Staphylococcus aureus</i> , GenBank X61270	Collins a Stephens (1991)
<i>Mycobacterium avium</i> komplex (MAC)					
IS901	1 472	2–8	MAC	atypická IS příbuzná ⁸ IS110 <i>Staphylococcus coelicolor</i> , GenBank X59272	Kunze aj. (1991)
IS902	1 470	10–12	<i>M. a. silvaticum</i>	atypická IS příbuzná IS110 <i>Staphylococcus coelicolor</i> GenBank X58030	Moss aj. (1992)
IS1110	1 457	0–15	MAC	atypická IS příbuzná IS110 <i>Staphylococcus coelicolor</i> GenBank Z28969	Hernandez Perez aj. (1994)
IS1245	1 313	3–27	MAC	klasická IS příbuzná IS1081 GenBank L33879	Guerrero aj. (1995)
IS1311	1 317	>3	MAC <i>M. a. avium</i>	klasická IS příbuzná IS1245 (85% homologie) GenBank U16276	Roiz aj. (1995)
IS1613	1 453	<8	MAC	data doposud nepublikována, připraveno k tisku ⁹	Bull aj. (1998)
IS1141	1 596	?	<i>M. intracellulare</i>	GenBank L10239	Via aj. (1995)
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> (MP)					
IS900	1 451	15–20	MP	atypická IS příbuzná IS110 <i>Staphylococcus coelicolor</i> GenBank X16293	Green aj. (1989)

Vysvětlivky – Explanatory notes:

* IS se liší pouze malým počtem bp a jsou proto považovány za stejný element – IS differ in a low number of bp only, so they are taken as the same element

** třída IS3 zahrnuje více než 80 IS (objevených u 40 bakteriálních druhů) s charakteristickou délkou 1 200 až 1 500 bp a obrácenými koncovými repeticemi v rozmezí 20 až 40 bp – class of IS3 comprises more than 80 IS (detected in 40 bacterial species) with a typical length of 1 200–1 500 bp and reverse end repetitions ranging between 20 and 40 bp

*** třída IS256 zahrnuje 33 IS, jejichž délka se pohybuje v rozmezí 1 298 bp až 1 486 bp, délka obrácených koncových repetice je 24 až 41 bp (většina z IS této třídy obsahuje přímé repetice dlouhé 8 až 9 bp) – class of IS256 comprises 33 IS, their length is in the range of 1 298–1 486 bp, the length of reverse end repetitions is 24–41 bp (the bulk of IS in this class contain direct repetitions 8–9 bp in length)

¹length, ²number of fingerprints, ³IS origin, ⁴description, ⁵reference, ⁶classical IS related to IS3 of enterobacterium class, ⁷classical IS related to, ⁸atypical IS related to, ⁹data not published before now, ready to be published

III. Některé IS u vybraných druhů podmíněně patogenních mykobakterií – Some IS in selected species of conditionally pathogenic mycobacteria

IS	Délka ¹ (bp)	Počet kopií ²	Původ ³ IS	Charakteristika ⁴	Citace ⁵
IS1096	2 275	variabilní ⁶	<i>M. smegmatis</i>	neúplné obrácené repetice ⁸ , ohraničené ⁹ 8 bp DR, GenBank M76495	Cirillo aj. (1991)
IS6120	1 500	>3	<i>M. smegmatis</i>	obrácené koncové 24 bp repetice ¹⁰ , ohraničené 9bp DR, GenBank M69182	Guilhot aj. (1992)
IS1137	1 361	nepublikováno	<i>M. smegmatis</i> <i>M. chitae</i>	IS třídy IS3 ¹¹ , GenBank X70913	Garcia aj. (1994)
IS1652	947	1–11	<i>M. kansasii</i>	neobsahuje koncové obrácené repetice ¹² , GenBank L11041	Yang aj. (1993)
IS6100	880	2	<i>M. fortuitum</i>	IS třídy IS6 ¹³ , GenBank X53635	Martin aj. (1990)

Vysvětlivky – Explanatory notes:

* třída IS6 je složena ze 45 různých IS s délkou v rozmezí 789 až 880 bp a obrácenými repeticemi dlouhými 15 až 20 bp (přímé repetice jsou dlouhé 8 bp) – IS6 class consists of 45 different IS with their length ranging between 789 and 880 bp, and of reverse repetitions 15–20 bp in length (the length of direct repetitions is 8 bp)

For 1–5 see Tab. II, ⁶variable, ⁷unpublished, ⁸incomplete reverse repetitions, ⁹limited by, ¹⁰reverse end 24 bp repetitions, ¹¹IS of IS3 class, ¹²it does not contain any end reverse repetitions, ¹³IS of IS6 class

2.2. Funkce IS

S IS elementy se lze setkat coby s transpozony či transponovatelnými elementy, které se projevují syntézou transponázy, která je kódována genem *tnp*. Transponáza rozpoznává koncové obrácené repetice transpozonu, ve kterých štěpí DNA. Rovněž štěpí cílovou sekvenci, do které bude IS vložena. Do těchto cílových sekvencí potom přenáší úsek DNA příslušící IS.

Kromě výše uvedené existence ORF byly v některých případech (Chandler a Fayet, 1993) objeveny geny pro syntézu proteinů nebo RNA transkripty, které autoregulují transpozici.

Některé IS mohou být replikovány a transponovány nezávisle na chromozomální replikaci. Bylo popsáno přemísťování IS110 kmene *Streptomyces coelicolor* A3 třídy aktinomycet (Bruton a Chater, 1987). Tato IS110 je známým občasným „cestujícím“ na mírném řádu C31, ze kterého je transponována do bakteriální chromozomální DNA.

3. MYKOBAKTERIÁLNÍ IS

První mykobakteriální IS byla objevena v roce 1989 za značně dramatických okolností v laboratoři Prof. Hermon-Taylor v St George Hospital v Londýně. Ke konci řešení zásadního grantového projektu se podařilo v laboratoři identifikovat a charakterizovat IS900 u druhu *M. a. paratuberculosis* (Green aj., 1989). Tím byla zachráněna existence laboratoře, která dodnes intenzivně pokračuje v dalším výzkumu, zejména v oblasti molekulární biologie *M. a. paratuberculosis* a *M. avium*. V následující části bude popsáno především využití IS při studiu epidemiologie závažných mykobakteriálních infekcí lidí a zvířat.

3.1. IS900 u *M. a. paratuberculosis*

IS900 patří mezi atypické bakteriální IS. Má však přímé přiléhající oblasti. Protože se samotná IS900 neduplikuje, je zřejmé, že se IS900 nemůže transponovat žádným mechanismem navrženým pro klasické IS elementy *E. coli*. Vykazuje však určitý stupeň specifity cílové rozpoznávací sekvence (viz kapitola 3.2.1.).

IS900 má velikost 1 451 bp. Jeden ORF (ORF1/197) kóduje protein složený z 399 aminokyselin označený jako p43. Na komplementárním řetězci ke genu p43 v IS900 byl detekován druhý ORF (označen ORF2). ORF2 je dlouhý 1 452 bp a kóduje protein složený ze 484 aminokyselin, který se pravděpodobně účastní transportu železa (Doran aj., 1997).

Vyskyt IS900 je omezen pouze na genom *M. a. paratuberculosis*, kde se vyskytuje v 15 až 20 rozptýlených kopiích (Green aj., 1989; Pavlík aj., 1999a). Z epidemiologického hlediska je tedy IS900 vysoce stabilním, signálním markerem využívaným k přesné identifikaci *M. a. paratuberculosis* metodou PCR. Rozmanitost lokalizace a počty IS900 na genomu jsou pak

využívány v metodě RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism (Kunze aj., 1991, 1992; Pavlík aj., 1995, 1999a).

Základním předpokladem pro využití metody RFLP v epizootologické studii je stabilita RFLP typu určitého sledovaného kmene, tedy stabilita polohy IS900 na genomu *M. a. paratuberculosis*. Schopnost transpozice specifické sekvence IS900 pro *M. a. paratuberculosis* byla popsána po jejím přenesení do genomu *M. smegmatis* (England aj., 1991). Výsledky z vyšetření metodou DNA fingerprinting 19 subkultur jednoho kmene však svědčí pro stabilitu této sekvence (Pavlík aj., 1999a). Také po pasáži přes infikované zvíře je zachován stejný RFLP profil kmenů *M. a. paratuberculosis* (Whipple aj., 1990).

3.2. IS u kmenů komplexu *M. avium*

Na základě povrchových antigenů je komplex *M. avium* dělen na 28 sérotypů (Wolinsky a Schaeffer, 1973.). Z veterinárního hlediska jsou nejvýznamnější kmeny sérotypů 1, 2 a 3, které většinou vyvolávají generalizovanou tuberkulózu ptáků, případně jiných druhů zvířat. Kmeny ostatních sérotypů jsou pro drůbež nevirulentní (Pienning aj., 1972). Přitom některé sérotypy (4, 6, 8, 9) bývají izolovány od zvířat (zejména prasat), z vnějšího prostředí a od lidí (Meissner a Anz, 1977; Kunze aj., 1991; Ritacco aj., 1998). Pro řešení epidemiologických otázek se osvědčilo využívat druhově specifických IS.

Zdravotní význam kmenů komplexu *M. avium* stoupá jak v lidské, tak ve zvířecí populaci (Pavlík aj., 1999b). Proto je tento původce v současné době intenzivně zkoumán, a to především metodami molekulární biologie. Dnes je popsáno již několik specifických IS pro kmeny tohoto původce.

3.2.1. Bližší charakteristika IS901 a IS902

Jako první z těchto IS byla objevena IS901 (Kunze aj., 1991). Byla prokázána u tzv. kmenů „wood pigeon“, které byly později zařazeny ke druhu *M. avium* subsp. *silvaticum* (Thorel aj., 1990). Její velikost činí 1 472 bp, přičemž obsahuje jeden otevřený čtecí rámec (ORF1), který kóduje protein složený ze 401 aminokyselin (Kunze aj., 1991).

Sekvence IS901 mají přiléhající oblast dlouhou 300 bp (FR300bp). V jednotlivých kopiích FR, které ohraničují jednotlivé IS901 rozptýlené po genomu, existují menší sekvencní rozdíly, které mají za následek polymorfismus kmenů komplexu *M. avium* (Kunze aj., 1991). Uvažuje se o tom, že se tyto krátké sekvence mohou zapojit do integrace IS elementů rekombinací spolu se sekvencí TTCCTT, která je přítomná v cílovém místě (lokusu pro IS901) a také na levém konci elementu IS901.

Prakticky současně byla v laboratoři Prof. Hermon-Taylor objevena IS902 vykazující s IS901 98% homologii (Moss aj., 1992). Na komplementárním řetězci ke

genu pro transponázu se nachází *ORF2* dlouhý 1 431 bp, který kóduje protein o sekvenci 477 aminokyselin.

Stabilita výskytu *IS901* u kmenů izolovaných především z klinického materiálu veterinárních laboratorí (ptáci, domácí zvířata, prostředí stájí) se využívá k rychlé diagnostice metodou PCR (Pavlik aj., 1999c). Z předběžných výsledků získaných v naší laboratorii při testování 84 kmenů komplexu *M. avium* izolovaných od prasat, lidí, ptáků a referenčních sérotypových kmenů, lze potvrdit přítomnost 2 až 13 kopií *IS901*, které na genomu poprvé detekovali Kunze aj. (1991).

3.2.1.1. Vztah mezi *IS901* a sérotypy komplexu *M. avium*

V epidemiologické studii autorů Ritacco aj. (1998) byly kmeny komplexu *M. avium* rozděleny na základě přítomnosti různého počtu a polohy *IS1245* na genomu ve vztahu k sérotypu. Molekulární analýza v podstatě odpovídala výsledkům sérotypizace. Sérotypy 1 až 3 vytvářely po hybridizaci se sondou *IS1245* nápadné DNA profily, které se skládaly ze tří pruhů a byly nacházeny s pozoruhodnou homogenitou u všech ptačích izolátů pocházejících ze dvou kontinentů. Proto byl tento RFLP typ označen jako „aviární typ“.

3.2.1.2. Korelace mezi přítomností *IS901* a virulencí kmenů pro ptáky

Podle výsledků autorů Kunze aj. (1991) byla *IS901* prokázána v DNA kmenů komplexu *M. avium* izolovaných z ptáků a dalších zvířat. Nebyla však detekována v DNA žádného izolátu od pacientů s HIV/AIDS a z vnějšího prostředí (Kunze aj., 1991). Přítomnost *IS901* v genomu kmenů koreluje s jejich vyšší virulencí pro myši BALB/c, u kterých došlo k pomnožení těchto kmenů ve slezině a játrech s následující proliferací do tkáně (Kunze aj., 1992).

V naší laboratorii jsme za účelem posouzení korelace mezi přítomností *IS901* a virulencí pro ptáky paralelně vyšetřili 720 kmenů metodou PCR a biologickými pokusy na kuřících (Pavlik aj., 1999c). Zjistili jsme, že z těchto 720 kmenů bylo virulentních pro kuřice v biologickém pokusu (generalizovaná tuberkulóza) 148 kmenů, z nichž 99,2 % obsahovalo *IS901*. Ostatních 544 kmenů bylo pro kuřice nevirulentních, přičemž u 16 (3,0 %) kmenů byla prokázána *IS901*.

3.2.2. Bližší charakteristika *IS1245*

K bližší identifikaci kmenů komplexu *M. avium* (MAC) je v současné době využíváno studia přítomnosti *IS1245* (Guerrero aj., 1995; Ritacco aj., 1998). Tato *IS* s velikostí 1 313 bp (včetně koncových obrácených repetit) patří do skupiny typických *IS*.

3.2.2.1. Vhodnost *IS1245* pro epidemiologické studie

Výskyt *IS1245* je omezen na druhy komplexu *M. avium*, *M. a. paratuberculosis* a kmenů „wood pigeon“.

Kmeny *M. intracellulare* tento genomový element zcela postrádají (Guerrero aj., 1995; Bono aj., 1995). Ve velkém počtu kopií (více než 20) je nacházen v izolátech od lidí a prasat. Naproti tomu u kmenů komplexu *M. avium* virulentních pro drůbež (obsahujících *IS901*) byly objeveny pouze tři kopie tohoto elementu (Bono aj., 1995; Ritacco aj., 1998; Dvorská aj., 1999). Genetická stabilita a spolehlivost *IS1245* jako epidemiologického markeru pro většinu klinických izolátů byla potvrzena shodnými fingerprynty získanými v pětiletém intervalu od pěti pacientů (Ritacco aj., 1998).

IS1245 byla rovněž prokázána u kmenů *M. a. paratuberculosis* (Ritacco aj., 1998), kdy se získané RFLP typy nejvíce podobaly RFLP typům u kmenů komplexu *M. avium* sérotypu 9. Přítomnost *IS1245* u kmenů *M. a. paratuberculosis* opodstatňuje tedy zařazení tohoto poddruhu k druhu *M. avium*, jak bylo již navrženo koncem 80. let (Thorel aj., 1990).

3.2.2.2. Vztah mezi *IS1245* a serotypy komplexu *M. avium*

Kmeny sérotypů 4 až 6, 8 až 11, 21

Většina humánních izolátů, které patřily k sérotypům 4, 6 a 8, vytvářela polymorfní RFLP profily o 6 až 20 pruzích. Byly označeny jako „neaviární“ RFLP typy (Ritacco aj., 1998). Rozsáhlá diverzita RFLP typů byla rovněž pozorována mezi izoláty z prasat. Tyto izoláty vytvářely jak „aviární“, tak „neaviární“ RFLP typy. *IS1245*-fingerprynty izolátů z jelena a ovce byly „aviárního“ RFLP typu. Přítomnost „aviárního“ RFLP typu v izolátech prasat, ovce, jelena a jednoho člověka vedla k úvaze, že skupina kmenů, vytvářející uvnitř komplexu *M. avium* pozoruhodný konzervativní taxon, je potenciálním patogenem pro savce (Ritacco aj., 1998).

Kmeny sérotypů 7, 12 až 20, 22 až 28

Kmeny těchto sérotypů neobsahují *IS1245*, čímž se značně znesnadňuje jejich bližší identifikace (Bono aj., 1995; Guerrero aj., 1995).

3.2.3. Charakteristika *IS1311*

IS1311 vykazuje s *IS1245* vysoký stupeň podobnosti sekvenční homologie – 85 % (Roiz aj., 1995). Často proto při nedodržení reakčních podmínek dochází v metodě RFLP ke zkřížené hybridizaci mezi těmito elementy, což značně komplikuje hodnocení jednotlivých RFLP typů. Velikost této sekvence je 1 311 bp (Garzelli aj., 1997). Na genomu se vyskytuje ve více než třech kopiích (Roiz aj., 1995).

Tato *IS* sekvence se rovněž nachází v izolátech pacientů HIV/AIDS pozitivních i negativních. RFLP typy, získané například po hybridizaci kmenů izolovaných od pacientů s HIV/AIDS ve Španělsku, vykazovaly vy-

sokou variabilitu: více než 19 různých RFLP typů pozorovaných u 75 izolátů (Roiz aj., 1995).

3.2.4. *IS1110* u kmenů komplexu *M. avium*

Počátkem 90. let byla v humánních kmenech komplexu *M. avium* objevena 1 457 bp dlouhá *IS* (Hernandez Perez aj., 1994). Sekvence byla identifikována během studia přítomnosti plazmidů u jednoho kmene *M. avium* izolovaného od pacienta s HIV/AIDS. Na základě zjištěné 60% homologie se sekvencemi třídy *IS900* *M. a. paratuberculosis*, *IS901* a *IS902* kmenů komplexu *M. avium* a *IS116* druhu *Streptomyces clavuligerus* byl tento element označen jako *IS1110*. Ve skupině komplexu *M. avium* je však pro svou značnou mobilitu popisován vzácně.

3.2.5. Charakteristika *IS1613*

Zatím poslední objevenou *IS* u kmenů komplexu *M. avium* je *IS1613* dlouhá 1 453 bp (Bull aj., 1998). Tato sekvence byla náhodně objevena u dvou izolátů od pacientů s HIV/AIDS ze Španělska, které v metodě PCR reagovaly jak ve Španělsku tak i v naší laboratoři na přítomnost *IS900*, charakteristické pro *M. a. paratuberculosis* (Guerrero aj., 1995). To vedlo k úvaze o existenci blízké příbuzné *IS* vyskytující se u kmenů komplexu *M. avium*. Na základě sekvenování *IS1613* byla zjištěna 83,5% podobnost s *IS900*. V uvedených lidských kmenech vytvářela sekvence rozdílné RFLP typy sestavené z osmi kopií *IS1613*. Doposud byla její přítomnost prokázána u lidských kmenů ze Španělska a Německa (Bull aj., 1998). V současné době jsou v naší laboratoři testovány kmeny od zvířat, ptáků a z vnějšího prostředí (Bull aj., 1999).

3.2.6. Charakteristika *IS1141*

U kmenů komplexu *M. avium* byla detekována sekvence *IS1141* (Via a Falkinhamj, 1995), která je dříve specifikována jen pro *M. intracellulare* (serotypy 7, 12 až 20, 22 až 28). Celková délka DNA elementu je 1 596 bp.

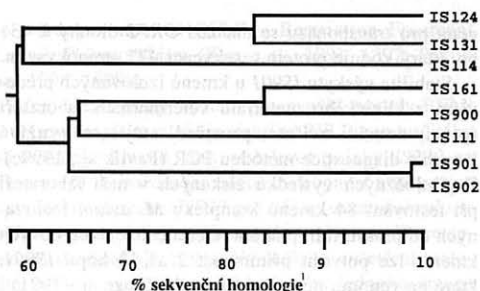
Fylogenetická příbuznost výše popsaných *IS* elementů komplexu *M. avium* (MAC) je znázorněna na obr. 1.

3.3. *IS* u kmenů komplexu *M. tuberculosis*

Komplex *M. tuberculosis* zahrnuje tyto druhy mykobakterií: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* a vakcinační kmen *M. bovis* BCG. Metodou DNA fingerprinting je možné od sebe tyto jednotlivé druhy, případně kmeny, spolehlivě odlišit.

3.3.1. *IS6110* u kmenů komplexu *M. tuberculosis*

IS6110 byla poprvé izolována z DNA kmene *M. tuberculosis* klinického vzorku izolovaného v roce 1990



1. Fylogenetická příbuznost mezi *IS* elementy komplexu *M. avium* získaná UPGMA analýzou pomocí software GelCompar (při konstrukci dendrogramu bylo využito nukleotidových sekvencí z NCBI GenBank <http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>) – Phylogenetic affinity between *IS* elements of *M. avium* complex determined by UPGMA analysis using GelCompar software (nucleotide sequences from NCBI GenBank <http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank> were used to construct the dendrogram)

1% sequence homology

(Thierry aj., 1990). Je dlouhá 1 360 bp a na svých koncích obsahuje obrácené repetitivní sekvence o délce 28 bp. Je specifická pro kmeny komplexu *M. tuberculosis*, přičemž u většiny druhů tohoto komplexu se vyskytuje ve vysokém počtu kopií (10 až 20 kopií na genom). Naproti tomu u kmenů *M. bovis* se vyskytuje v nízkém počtu (1 až 5 kopií na genom). Poloha *IS6110* v genomu není úplně nahodilá. Element se přednostně začleňuje do místa *ipl*, a to vždy ve stejné orientaci (Fang a Forbes, 1997).

3.3.2. Charakteristika *IS1081* u *M. bovis*

IS1081 byla klonována a charakterizována u *M. bovis* v roce 1991 (Collins a Stephens, 1991). Tato typická *IS* má délku 1 324 bp, má 15 bp dlouhé koncové obrácené repetice a na genomu se vyskytuje v pěti až sedmi kopiích. Pokud je použita jako sonda v metodice DNA fingerprinting, vykazují kmeny s touto *IS* minimální polymorfismus, z čehož vyplývá nízká rozlišovací schopnost. Tento fakt vede k úvaze, že elementy komplexu *M. tuberculosis* mají limitovanou mobilitu anebo vysoký stupeň inzerční specifity (van Soolingen aj., 1991, 1994). *IS1081* je využíváno k diferenciaci divokých kmenů *M. bovis* od vakcinačních kmenů *M. bovis* BCG.

3.4. Ostatní *IS* u jiných druhů mykobakterií

Z ostatních atypických mykobakterií byly vybrány *IS* *M. smegmatis*, *M. kansasii* a *M. fortuitum* (tab. III).

3.4.1. *IS* u *M. smegmatis*

U druhu *M. smegmatis* jsme do tohoto přehledu vybrali tři popsané významné *IS*: *IS1096*, *IS6120* a *IS1137*.

Cirillo aj. (1991) integrovali plazmid pYUB25, obsahující gen pro beta-galaktosidázu, jednoduchým crossing-overem do chromozomu *M. smegmatis*. Vizuální screening inaktivovaného genu pro beta-galaktosidázu vedl k průkazu *IS* ve výsledném kmeni. Tato *IS*, druhově specifická pro *M. smegmatis*, byla označena jako *IS1096*. Má délku 2 275 bp a obsahuje dva otevřené *ORF* s odlišnou orientací. Delší z těchto *ORF* kóduje protein transponázu. Na koncích se nacházejí obrácené repetice o délce 25 bp.

IS6120

Další druhově specifickou *IS* pro kmeny *M. smegmatis* je *IS6120*, která se nachází na genomu v různém počtu kopií (Guilhot, 1992). Délka této sekvence je 1 500 bp, má neúplné koncové obrácené repetice, které jsou ohraničeny 9 bp přímou repeticí. *IS6120* obsahuje dva nepřekrývající se otevřené čtecí rámce (*ORFA* a *ORFB*) se stejnou orientací, z nichž *ORFB* kóduje transponázu.

IS1137

Poslední významnou *IS* je *IS1137*, která je přiřazována ke třídě *IS3* (Garcia aj., 1994). Tato třída je charakterizována svojí délkou 1 200 až 1 500 bp. Sekvence je dlouhá 1 361 bp a její konce jsou tvořeny neúplnými obrácenými repeticemi. Element je ohraničen 3 bp dlouhou přímou repeticí. *IS1137* obsahuje tři hlavní *ORF*. Hostitelské rozmezí *IS1137* je velice úzké, protože dosud byla nalezena pouze u *M. smegmatis* a *M. chitae*. Další druhy mykobakterií tento element neobsahují.

3.4.2. IS1652 u *M. kansasii*

Analýzou genomové DNA geneticky netypických poddruhů *M. kansasii* byla nalezena repetitivní *IS1652* (Yang, 1993). Je dlouhá 947 bp a na genomu je přítomna v jedné až 11 kopiích. Na koncích obsahuje přímé repetice dlouhé 3 bp (TAG), nemá však koncové obrácené repetice ani *ORF*. Hostitelské rozmezí této sekvence je omezeno pouze na netypické poddruhy *M. kansasii*. Při použití *IS1652* jako sondy při DNA fingerprintingu byla pozorována mezi různými izoláty *M. kansasii* významná heterogenita (Yang, 1993).

3.4.3. IS6100 u *M. fortuitum*

Bakteriální rezistence k antibiotikům je často zprostředkována plazmidy, nebo je spojována s geny nesenými transpozicií elementy. U rychle rostoucích druhů mykobakterií byly detekovány aktivity modifikující antibiotika. Martin aj. (1990) izolovali, klonovali a sekvencovali u *M. fortuitum* genetickou oblast zodpovědnou za rezistenci k sulfonamidu. Tato oblast, která

má otevřený čtecí rámec, je dlouhá 880 bp a patří do třídy *IS6*, byla označena jako *IS6100*.

4. VYUŽITÍ *IS* PŘI STUDIU EPIDEMIOLOGIE A EPIZOOTOLOGIE MYKOBAKTERIÁLNÍCH INFEKcí

Vzhledem k tomu, že je velmi složité od sebe odlišit kmeny jednotlivých mykobakteriálních druhů bakteriologickými nebo biochemickými metodami, jsou mykobakterie od poloviny 80. let testovány metodami molekulární biologie, především již zmíněnou metodou DNA fingerprinting. Značný pokrok v hodnocení výsledků potom přinesla především hybridizace s druhově specifickými sondami, tvořenými zejména *IS*, popísanými v tomto přehledném článku.

4.1. IS6110 v molekulární epidemiologii *M. tuberculosis*

Díky specifitě a vysokému počtu kopií v mykobakteriálním genomu je *IS6110* ideálním nástrojem pro analýzu restrikčních profilů kmenů *M. tuberculosis*, kterou vyvinuli Cave a spolupracovníci (Cave aj., 1991). V současné době se stala nejužívanější metodou diferenciací klinických izolátů po štěpení DNA *M. tuberculosis* RE *PvuII*, která vychází ze standardní metodologie vypracované van Embdenem (van Embden aj., 1993). Touto metodou získané fingerprinty jsou dále vyhodnocovány počítačovým programem GelCompar (Applied Maths, Kotrijk, Belgie). Tento program využívá, kromě jiných, statistickou metodu UPGMA (Sneath a Sokal, 1973), což je shluková analýza (cluster analysis) vedoucí k tvorbě dendrogramů na základě fylogenetické příbuznosti bakteriálních kmenů. Kmeny s restrikčním profilem se shodným počtem a lokalizací *IS6110* jsou tímto programem hodnoceny jako příbuzné a definovány jako kmeny klastrované. Naopak kmeny s individuálním počtem a lokalizací kopií *IS6110* na genomu jsou vyhodnoceny jako nepřibuzné a označeny jako kmeny neklastrované.

4.1.1. Možnosti praktického využití *IS6110* v epidemiologii bacilární tuberkulózy

Značný polymorfismus kmenů, které obsahují *IS6110* a její vysoká stabilita na genomu umožňují využívat tento element jako základní epidemiologický marker při studiu nejručnějších problémů, například při sledování nozokomiálních infekcí, mikroepidemií a prevalenčních studií (Mazurek aj., 1991; van Soolingen aj., 1991; Zhang aj., 1992; van Soolingen a Hermans, 1995; Kremer aj., 1996; Kubín aj., 1998, 1999a, b; Havelková aj., 1999). Rovněž je možné této metody využít pro studium opakovaných vzplanutí aktivní tuberkulózy u jednoho a téhož nemocného. Při odlišení endogenní reinfekce – reaktivace (onemocnění způsobené původním kmenem *M. tuberculosis*) od exogenní superinfekce vyvolané odlišným, novým kmenem *M. tuberculosis* (van Soolingen aj., 1991).

4.1.1.1. Studium reaktivace tuberkulózy

Značná variabilita DNA fingerprintů kmenů *M. tuberculosis* v populaci je využívána k definování nově získaných infekcí oproti reaktivovaným. Obecně platí, že při rychlém přenosu nově objevené infekce v populaci, hlavně v zemích s nižší životní úrovní, lze předpokládat nízkou heterogenitu v genomu *IS6110*. Tento nízký stupeň polymorfismu kmenů s *IS6110* na genomu je vysvětlován tím, že např. v Africe se uplatňuje jako zdroj infekce převážně mladší populace lidí (nižší věkový průměr obyvatel Afriky) s nově získanou infekcí. Při reaktivaci latentních infekcí u starší populace v zemích s vysokou migrací obyvatel může naopak stoupat polymorfismus *IS6110* (van Soolingen aj., 1991).

4.1.1.2. Studium šíření *M. tuberculosis* v lidské populaci

Další možností praktického využití jsou populační pozorování založená na *IS6110* fingerprintingu, při nichž byly zaznamenány různé příklady dosud neznámého přenosu kmenů *M. tuberculosis* uvnitř konkrétní skupiny ve společnosti. Sledování zvýšeného výskytu tuberkulózy mezi imunokompromitovanými pacienty v Seattlu (Tabet aj., 1994) a San Francisku (Small aj., 1994) odhalilo ohnisko nákazy mezi HIV/AIDS infikovanými pacienty. Populační studie bezdomovců a narkomanů prováděné v Melbourne a Amsterdamu odhalily konkrétní DNA fingerprint *M. tuberculosis*. Tento převládající RFLP typ byl výsledkem propuknutí ohniska nákazy právě uvnitř dané komunity (van Soolingen aj., 1991; Dwyer aj., 1994). Pomocí metody DNA fingerprinting byla také například v Holandsku odhalena tři odlišná ohniska rozsáhlé epidemie tuberkulózy uvnitř jedné geografické oblasti (van Soolingen a Hermans, 1995).

Obecně lze shrnout, že molekulárně epidemiologická metoda DNA fingerprinting je nejčastěji využívána:

- k potvrzení nebo vyloučení přenosu infekce mezi vnímavými jedinci,
- ke stanovení podílu různých genotypů *M. tuberculosis* v různých geografických oblastech, etnických a jiných skupinách obyvatelstva,
- k analyzování rodinných, lokálních a dalších mikroepidemií.

4.1.2. Studium přenosu, šíření a cirkulace kmenů *M. tuberculosis* v České republice

V pilotní molekulárně epidemiologické analýze kmenů *M. tuberculosis* izolovaných na území České republiky (van Soolingen aj., 1993; Kremer aj., 1996) byl zjištěn nejčastěji se vyskytující RFLP typ (29 %), který byl označen jako „český“ typ. Tento „český“ RFLP typ byl objeven ve 24 epidemiologicky nezávislých případech onemocnění vyvolaných kmeny *M. tuberculosis*. „Český“ typ byl pomocí programu Gel-Compar porovnán s databankou 2 630 fingerprintů kmenů *M. tuberculosis* pocházejících z 21 různých stá-

tů. V této bance *IS6110*-fingerprintů nebyl nalezen naprosto identický *IS6110*-fingerprint, pouze tři z 2 630 fingerprintů vykazovaly 85 až 90% podobnost. Ve studii byla také potvrzena značná heterogenita českých kmenů *M. tuberculosis* (Kremer aj., 1996).

4.1.2.1. Prevalenční studie

Na uvedené práce autorů van Soolingen aj. (1993) a Kremer aj. (1996) dále navazuje prevalenční studie, která byla zahájena v roce 1995. V této dosud probíhající studii bylo prozatím vyšetřeno 184 kmenů *M. tuberculosis* izolovaných od nemocných pocházejících z Prahy, Západočeského a Jihomoravského kraje. Tyto tři oblasti se navzájem liší svým charakterem (městská průmyslová aglomerace, převážně zemědělská oblast se sídly menší až střední velikosti) a epidemiologickými charakteristikami, zejména rozdílnou prevalencí baci-lární tuberkulózy.

Během studie se podařilo prokázat, že v oblastech s nízkou prevalencí onemocnění (Jihomoravský kraj s prevalencí 6,6 na 105 obyvatel) stoupá procentuální podíl klastrovaných, tj. příbuzných či zcela identických kmenů, které pak cirkulují v populaci ve formě mikroepidemií. Naopak v oblastech s vysokou prevalencí tuberkulózy převažují nálezy kmenů neklastrovaných (nepříbuzných). V Praze, která má více než dvojnásobně vyšší prevalenci (15,7 na 105 obyvatel) v porovnání s Jihomoravským krajem, dosáhl procentuální podíl neklastrovaných kmenů hodnoty 70,7 %, zatímco na jižní Moravě činil 48,9 %. V souladu s literárními údaji (van Soolingen aj., 1991) a s přihlédnutím k vyššímu věkovému průměru osob vylučujících neklastrované kmeny *M. tuberculosis*, byla onemocnění jimi vyvolaná přisouzena endogenní reaktivaci perzistující infekce. Při vylučování kmenů klastrovaných lze naopak předpokládat recentní exogenní superinfekci (Kubín aj., 1998, 1999a; Havelková aj., 1999).

4.1.2.2. Analýza suspektních mikroepidemií

Při studiu suspektních mikroepidemií v České republice byly analyzovány lokální mikroepidemie a mikroepidemie vyvolané multirezistentním *M. tuberculosis*. V tomto konkrétním případě se jednalo o kombinovanou rezistenci na izoniazid, streptomycin, etambutol a rifampicin (Havelková aj., 1999; Kubín aj., 1998a).

Lokální mikroepidemie tuberkulózy v České republice

Mikroepidemie tuberkulózy v Jihomoravském kraji byly zaznamenány celkem v šesti lokalitách. Jednalo se o šest klastrů, z nichž tři byly tvořeny vždy dvěma kmeny se shodným restriktivním profilem. Další tři klastry byly tvořeny šesti, třemi a dvěma kmeny. Zajímavá je skutečnost, že po zařazení DNA fingerprintů z každé mikroepidemie do hierarchie dendrogramu všech dpo-

sud testovaných českých kmenů se ke třem ze šesti sledovaných mikroepidemií přiřadily kmeny izolované i od osob žijících mimo Jihomoravský kraj (jeden z Prahy, jeden ze Středočeského a šest ze Západočeského kraje). Další pět kmenů pocházelo od nemocných žijících sice na jižní Moravě, ale v lokalitách vzdálených od místa, kde byly poprvé mikroepidemie zachyceny.

Za nanejvýš překvapivé lze považovat zjištění genetické identity kmenů z jedné z jihomoravských mikroepidemií s RFLP typem kmene *M. tuberculosis* izolovaného v roce 1995 z biologického materiálu dítěte ze Středočeského kraje, které zemřelo na nepoznanou bacilární meningitidu. Na tomto případě lze velmi dobře demonstrovat užité metody DNA fingerprinting pro určení zdrojů tuberkulózní infekce v populaci. V době onemocnění dítěte v roce 1995 byla provedena restrikční analýza kmene *M. tuberculosis*, který byl vylučován jedním z příbuzných zemřelého dítěte. Přitom bylo prokázáno, že tento kmen má naprosto odlišný RFLP typ a příbuzný tedy nebyl zdrojem infekce pro dítě (Kremer aj., 1996).

Mikroepidemie tuberkulózy vyvolané multirezistentním kmenem *M. tuberculosis*

Mikroepidemie tuberkulózy vyvolané multirezistentním kmenem *M. tuberculosis* (MDR TB), která vždy představuje pro nemocného krajně nepříznivou prognózu onemocnění, se odvíjela od skupiny tří vězňů (van Soelingen aj., 1991). Do roku 1998, kdy proběhla prozatím poslední restrikční analýza multirezistentních kmenů, byl vyšetřen soubor 21 nemocných se vzájemnými suspektními kontakty. Je pravděpodobné, že postupně se k již získaným RFLP typům budou přiřazovat další kmeny s totožným nebo příbuzným profilem. Z uvedeného souboru měli tři nemocní v epidemiologické anamnéze společný pobyt ve vězení, další čtyři byli bezdomovci, ostatní udávali trvalé bydliště ve čtyřech různých krajích České republiky. Do konce roku 1997 zemřelo na tuberkulózu pět nemocných pacientů. U 14 nemocných byl nalezen identický RFLP typ označený jako skupina A, dalších sedm nemocných (skupina B) vylučovalo *M. tuberculosis* se stejným základním RFLP typem, který však obsahoval ještě navíc dvě kopie *IS6110*.

V tomto případě nelze zcela vyloučit transpozici tohoto elementu související s nestabilitou původního genotypu DNA. Pro tuto hypotézu svědčí i nápadné nakupení vylučování kmenů s profilem A v období od roku 1991 do roku 1995 a také to, že naopak vylučování kmenů s RFLP typem B začalo být zaznamenáváno s časovým odstupem – žádný nemocný vylučující *M. tuberculosis* s RFLP typem B nebyl evidován před rokem 1995. Mikroepidemie multirezistentní tuberkulózy tak poukázala na riziko šíření tohoto onemocnění ve skupině sociálně problematických jedinců (Kubín aj., 1999b; Havelková aj., 1999).

4.1.3. Další využití *IS6110* v komplexu *M. tuberculosis*

IS6110 našla uplatnění i v poněkud netradiční oblasti, a to při potvrzování diagnózy kostní tuberkulózy v archeologických kostních nálezech (Dixon aj., 1995; Horváth aj., 1997) nebo v mumifikovaných měkkých tkáních (Salo aj., 1994). Dojde-li v takových studiích v izolátu DNA z kosti k amplifikaci úseku DNA specifického pro *M. tuberculosis*, je možné považovat přítomnost tohoto mikroorganismu ve vzorku za prokázanou. Zasažení historických populací mykobakteriálními infekcemi je tedy nyní možné odvozovat nejen klasickými paleopatologickými metodami z projevů na kosterních nálezech, ale také s využitím PCR. V kosterních pozůstatcích se DNA nachází ve fragmentovaném stavu. Fragменты obvykle nepřesahují velikost 200 bp a pravděpodobnost amplifikace takové DNA klesá se vzrůstající délkou fragmentu. Tuto skutečnost je možné využít k vyloučení možné falešné pozitivy při PCR (Eisenach aj., 1990, 1991, 1993; Cave aj., 1991).

4.2. Molekulární epidemiologie *M. bovis*

M. bovis patří do homogenní skupiny mykobakterií komplexu *M. tuberculosis*, kdy je často pokládán spíše za biovar *M. tuberculosis* než za samostatný druh. Z epidemiologického a epizootologického hlediska však především tuberkulóza vyvolaná *M. bovis* představuje infekční onemocnění postihující velký počet zvířecích druhů. Infekce skotu a dalších domácích zvířat v rozvojových státech způsobuje značné ekonomické ztráty v zemědělství a současně je potenciální zoonóza (Thoen a Hagsman, 1996).

Pokusy spojené s eradikací tohoto onemocnění skotu v některých ekonomicky rozvinutých státech nebyly úspěšné. Na Novém Zélandu byl rezervoár infekce zjištěn v populaci vačnatce kuska liščího (*Trichosurus vulpecula*). Poněvadž toto zvíře na Novém Zélandu chráněné zákonem, není možné odstřelem nebo odchycením těchto zvířat omezit zdroj nákazy (Skuce aj., 1996). V Irsku a Velké Británii jsou významným zdrojem infekce *M. bovis* především jezevci (Skuce aj., 1996). Bylo tedy nutné zodpovědět četné otázky z hlediska šíření určitých kmenů v populaci zvířat a lidí.

4.2.1. Využití metody RFLP s různými sondami

Uvnitř komplexu *M. tuberculosis* bylo objeveno pět různých genetických elementů (Poulet a Cole, 1995): *IS6110*, *IS1081*, *PGRS* (polymorfic GC-rich repeat sequence), DR (direct repeat) a MPTR (major polymorphic tandem repeat). Dva z těchto elementů – *IS6110* a *IS1081* jsou charakteristické pro celý komplex *M. tuberculosis*.

IS6110

RFLP analýza s *IS6110* sondou je dnes běžně uznávanou a používanou metodou v molekulární epidemiologii.

logii humánní tuberkulózy (van Embden aj., 1993; van Soolingen aj., 1993). *IS6110* je na genomu kmenů *M. tuberculosis* přítomna v různém počtu a poloze kopií (van Soolingen aj., 1991). U izolátů *M. bovis* se však vyskytuje pouze v jedné nebo několika málo kopiích, čímž je využití *IS6110* u kmenů *M. bovis* relativně omezeno (Collins aj., 1993). Bylo ji však možné využít v kombinaci RFLP s REA (Restriction Endonuclease Analysis). Protože je REA pro svou složitost v odečítání vzniklých fragmentových soustav v praxi méně využívána, použili Collins aj., (1993) *IS6110* sekvenci k rozdělení 95 REA-typů získaných ze 160 izolátů od skotu pouze do 15 RFLP-typů. Ty obsahovaly pouze jednu kopii *IS6110*. Naproti tomu izoláty od jiných druhů zvířat obsahovaly několik kopií *IS6110*.

IS1081

Rovněž *IS1081*, identifikovaná u druhů komplexu *M. tuberculosis*, vykazuje málo RFLP-typů (Collins a Stephens, 1991). Proto *IS1081* není vhodným genetickým markerem pro epidemiologii bovinní tuberkulózy. Přesto je však možné pomocí *IS1081* od sebe odlišit kmeny *M. bovis* a *M. bovis* BCG, které jsou pro svoji blízkou příbuznost považovány za varianty jednoho druhu (van Soolingen aj., 1992).

PGRS, DR, MPTR

Systematické srovnávání rozlišovacích schopností jednotlivých genetických elementů (*IS6110*, *IS1081*, PGRS, DR a MPTR) vedlo k nahrazení RFLP-*IS6110* a RFLP-*IS1081* fingerprintů analýzou využívající DR a PGRS. Ke zvýšení diskriminačních schopností mezi kmeny *M. bovis* je doporučováno využívat kombinace sond PGRS, DR a *IS6110*. Genomová DNA *M. bovis* byla pro PGRS a DR fingerprinty štěpena RE *PvuII* a *AluI*. Pomocí RFLP bylo identifikováno 17 různých RFLP typů po použití sondy *IS6110* a po 18 RFLP typech se sondami DR a PGRS. Přitom kombinací těchto sond bylo určeno celkem 39 různých RFLP typů označených třípísmenným kódem (Skuce aj., 1996).

4.2.2. Vztah určitého DNA typu kmene *M. bovis* k hostiteli

K identifikaci 210 izolátů *M. bovis* pomocí RFLP analýzy byly použity sondy *IS6110*, DR a na genomu často se opakující sekvence PGRS. Kmeny byly izolovány především od skotu, jezevců, jelenů, ovcí, lidí a prasat. Bylo zjištěno, že kmeny skotu nashromážděné v letech 1989 až 1994 v Severním Irsku a v Irské republice byly stejného RFLP typu (třípísmenného kódu popsaného výše). Tento identický kód (ACA), který obsahoval pouze jednu kopii *IS6110*, se vyskytoval u všech izolátů. Z toho vyplývá, že v této oblasti cirkuloval mezi různými hostiteli kmen stejného RFLP typu, tedy kmen s největší pravděpodobností stejného původu (Skuce aj., 1996). Rovněž je zřejmé, že kon-

krétní RFLP typ nebyl přednostně izolován z žádného určitého živočišného druhu (Skuce aj., 1996).

Při této studii bylo také zjištěno, že RFLP typ detekovaný u kmenů izolovaných od jezevců, byl shodný s kmeny izolovanými od skotu pocházejícího ze stejné geografické oblasti. To tedy potvrzuje předpoklad, že rezervoárem *M. bovis* je v této oblasti jezevec, který je hlavním rizikovým faktorem šíření bovinní tuberkulózy mezi jednotlivými stády skotu (Skuce aj., 1996).

Přitom ale tyto kmeny vytvářely poměrně složité komplexy s několika kopiemi krátké sekvence PGRS (Skuce aj., 1996). Z toho vyplývá, že RFLP-PGRS může být i samostatně použitelná analýza v epidemiologii bovinní tuberkulózy. Pokud je nutné dále rozlišit stejné RFLP PGRS-typy, je možné využít DNA štěpenou *AluI* k získání DR fingerprintů (Cousins aj., 1993).

4.3. Molekulární epidemiologie u kmenů *M. a. paratuberculosis*

Značný pokrok při studiu epidemiologie paratuberkulózy z hlediska reprodukovatelnosti a zejména standardizace přinesl objev specifické *IS900* pro *M. a. paratuberculosis* (Green aj., 1989). V následujícím období byla využita tato specifická *IS900* jako sonda při metodě RFLP v mnoha laboratořích (Collins aj., 1990; Whipple aj., 1990; de Lisle aj., 1992, 1993; Pavlík aj., 1994, 1995, 1996; Bauerfeind aj., 1996; Pavlík aj., 1999a, d, e, f).

4.3.1. Používání různých restričních endonukleáz

Ke štěpení DNA *M. a. paratuberculosis* bylo použito ve výše uvedených laboratořích různých RE. Collins aj. (1990) a de Lisle aj. (1992, 1993) použili RE *BstEII*. Bauerfeind aj. (1996) použili RE *PvuII*. Whipple aj. (1990) použili kombinaci čtyř RE *BclI*, *BstEII*, *PstI* a *PvuII*. V letech 1993 až 1994 byla v naší laboratoři na základě publikovaných výsledků (Collins aj., 1990; de Lisle aj., 1992, 1993; Whipple aj., 1990) pracována metoda RFLP s RE *PstI* a následně pro potvrzení epizootologických souvislostí štěpení s RE *BstEII* (Pavlík aj., 1994, 1995, 1996, 1999a, d, e, f). Důvodů, proč se začalo v naší laboratoři používat paralelního vyšetření dvěma RE (*PstI* a *BstEII*) bylo několik. DNA fingerprint po štěpení RE *BstEII* je představován menším počtem fragmentů, oproti DNA fingerprintům získaným po štěpení *PstI*, která štěpí DNA uvnitř specifického fragmentu *IS900*. Význam vyšetření oběma RE je patrný zejména u skupiny kmenů RFLP typu B (štěpení RE *PstI*), kdy při paralelním štěpení RE *BstEII* bylo zjištěno dalších 14 RFLP typů (Pavlík aj., 1999a).

4.3.2. Návrh standardizace metody

Obecnou nevýhodou DNA typizace, se kterou jsme se setkali i při naší práci, je poměrně složitě vyhodnocení komplexních spekter fragmentů po hybridizaci při použití různých RE. Používání radioaktivního materiálu

při značení DNA sond může také komplikovat širokou využitelnost této metody v rutinní praxi mnoha laboratorí. Proto jsme navrhli standardizaci metody (Pavlík aj., 1999a), se kterou je možné se seznámit na domácí stránce naší laboratoře:
<http://www.vri.cz/wwwrflptext.htm>

Důraz byl kladen na univerzálnost přípravy sondy, neradioaktivní značení a závěrečné zpracování výsledků pomocí vhodného softwaru. Přistoupilo se proto k používání sondy připravené PCR amplifikací a k neradioaktivnímu značení ECL (Amersham). Výsledné DNA fingerprinty byly snímány CCD kamerou a analyzovány pomocí software Gel Manager (Biosystematika, Tavistock, UK) a od roku 1998 Gel Compar (Applied Maths, Kotrijk, Belgie). Po paralelním vyšetření DNA jednotlivých kmenů RE *Pst* I (RFLP typy A-M) a *Bst*E II (RFLP typy C1-20, S1, I1) bylo celkem zjištěno 28 různých RFLP typů, označených například B-C1.

4.3.3. Molekulární epizootologie paratuberkulózy v České republice a Slovenské republice

Po zavedení RFLP bylo možné v mykobakteriologické laboratoři na VÚVeL v Brně zpětně provést epizootologickou studii týkající se šíření paratuberkulózy v posledních více než 10 letech mezi jednotlivými stády přežvýkavců v České republice a v některých stádech ve Slovenské republice. Rovněž bylo možné porovnat kmeny *M. a. paratuberculosis* izolované od lidí nemocných Crohnovou chorobou (Pavlík aj., 1994, 1995, 1996, 1999a, d, e, f).

Na území České republiky se epizootologická situace paratuberkulózy vyvíjela nepříznivě v závislosti na liberalizaci obchodu po roce 1989. U skotu byla zjišťována paratuberkulóza do roku 1989 zcela ojediněle. Z analýzy výsledků do roku 1998 vyplynulo, že 24 stád původně chovaného skotu bylo infikováno kmeny *M. a. paratuberculosis* různých RFLP typů. Naproti tomu byly po roce 1989 vyšetřeny metodou RFLP kmeny *M. a. paratuberculosis* izolované ve 44 infikovaných importovaných stádech skotu z Dánska, Francie, Německa a Maďarska. Ve všech těchto stádech byly izolovány kmeny RFLP typu B-C1. Jen v 10 stádech byla navíc zjištěna infekce ještě kmenem jiného RFLP typu, avšak vždy pouze u jednoho zvířete. Pestrost RFLP typů kmenů izolovaných od původně chovaného skotu v České republice pravděpodobně svědčí o různých zdrojích infekce před rokem 1989 (Pavlík aj., 1999d).

U ostatních původně chovaných přežvýkavců v České republice byla paratuberkulóza prokázána u jednoho stáda ovcí, dvou stád koz a dvou stád farem chovaných jelenů. U ostatních importovaných přežvýkavců byla paratuberkulóza prokázána u jednoho stáda kozorůčků dagestánských z Estonska, dvou stád jelenů ze Skotska, jednoho stáda koz z Dánska a jednoho stáda ovcí z Polska. Rovněž u těchto přežvýkavců byla zjištěna vysoká homogenita (95 % kmenů RFLP typu B-C1) právě u importovaných zvířat oproti původně

chovaným domácím a divokým přežvýkavcům v České republice (Pavlík aj., 1999d).

Naproti tomu ve východní části Slovenské republiky jsme měli možnost vyšetřit kmeny *M. a. paratuberculosis* izolované v letech 1988 až 1992 z 11 farem skotu v okrese Prešov. Na 10 farmách byly izolovány kmeny stejného RFLP typu, přičemž na jedné farmě byly izolovány v rozmezí tří let kmeny dvou RFLP typů. Tuto vysokou regionální homogenitu je možné si vysvětlit stejným zdrojem infekce při pastevním způsobu chovu skotu (Pavlík aj., 1994, 1995). Stejně tomu bylo u infikovaného stáda skotu chovaného v západní části Slovenska, ve kterém byly na šesti farmách izolovány kmeny jen jednoho RFLP typu (Pavlík aj., 1994). V rámci slučování v polovině 80. let bylo provozně spojeno všech šest farem a vytvořena společná odchovna jalovic. Tím bylo možné si vysvětlit stoprocentní homogenitu kmenů izolovaných v průběhu několika let od skotu ze všech farem.

4.3.4. Studium šíření nákazy uvnitř stáda přežvýkavců

Detailně bylo šíření nákazy studováno ve stádě plemene Jersey importovaného v roce 1990 z Dánska v počtu 39 vysokobřezích jalovic od 17 chovatelů. První klinické příznaky paratuberkulózy se objevily u jedné krávy až dva roky po importu v souvislosti s druhým porodem. V té době zde byl izolován kmen RFLP typu B-C1 (Pavlík aj., 1994, 1995). Při následujícím plošném kultivačním vyšetření výkalů a orgánů poražených zvířat byla infekce kmeny RFLP typů B-C1 zjištěna u sedmi zvířat a kmenem RFLP typu A-C10 u jednoho dalšího původně importovaného zvířete. V důsledku včasného vyřazení všech infikovaných zvířat z chovu před jejich klinickým onemocněním potom nebyla v dalších dvou letech zjištěna u žádného zvířete infekce tímto RFLP typu A-C10 (Pavlík aj., 1995).

4.3.5. Molekulární epidemiologie paratuberkulózy u infikovaných importovaných a původně chovaných přežvýkavců

RFLP metody bylo využito rovněž při studiu šíření infekce *M. a. paratuberculosis* uvnitř infikovaného chovu přežvýkavců. Bylo přitom zjištěno, že importovaná zvířata pocházející od stejných chovatelů bývají infikována kmeny stejného RFLP typu. Pomocí této metody byl rovněž v několika chovech přežvýkavců v České republice sledován přenos *M. a. paratuberculosis* z importovaných zvířat na původně chovaná zvířata. V jednom chovu skotu v České republice byla paratuberkulóza zjištěna nejdříve u ovcí, které spásaly pastviny pro jalovice. Kmeny izolované od ovcí a později od skotu z osmi infikovaných farem tohoto stáda byly shodného RFLP typu A-C10. Z dalšího malého stáda plemene Blonde Aquitaine importovaného v roce 1990 z Francie (do provozně izolované stáje od infikovaného stáda), byly izolovány v roce 1993 kmeny rozdílného RFLP typu B-C1. Na základě těchto výsledků

je možné předpokládat, že byla importována již infikovaná zvířata jiným RFLP typem kmene *M. a. paratuberculosis* (Pavlík aj., 1994, 1995). V roce 1995 byl potom zachycen kmen tohoto RFLP typu B-C1 u původního skotu. Z toho je možné předpokládat zavlečení infekce tímto novým RFLP typem kmene B-C1 do původního stáda skotu (Pavlík aj., 1994).

U importovaného skotu různých plemen (Jersey, Holstein, Mont Belliarde, Charolais, Limousine, Salers a Blonde d'Aquitaine) nebyl zjištěn žádný vztah mezi plemenem a RFLP typem. Při analýze vyšetření 1 008 kmenů *M. a. paratuberculosis* nebyl rovněž zjištěn žádný vztah mezi druhem přežvýkavce a RFLP typem (Pavlík aj., 1999f).

4.3.6. Molekulární epidemiologie v chovu ovcí

Epizootologie byla studována i ve stádu ovcí v západní části České republiky. V letech 1988 až 1992 byla prokázána nákaza kmene pěti RFLP typů jak ve stádu bahnic, tak ve stádu beranů. Paratuberkulóza byla prokázána také u jednoho berana importovaného z Polska. U příkoupěného kozla prubříře byl prokázán kmen dalšího RFLP typu. Tuto značnou pestrost RFLP typů izolovaných kmenů bylo možné vysvětlit tvorbou stáda, do kterého byla nakupována zvířata od roku 1954 ze zahraničí (Polsko, Velká Británie a další) a z mnoha částí České a Slovenské republiky (Pavlík aj., 1994, 1995, 1999d; Pavlas aj., 1997).

4.3.7. Molekulární epidemiologie u divokých přežvýkavců

Do roku 1995 byla paratuberkulóza diagnostikována v České republice ojediněle: na jedné farmě u daňků skvrnitých, na třech farmách u jelenů evropských, v jedné oboře a volné přírodě u muflonů, srnců a jelenů (Pavlík aj., 1999d). V jedné lokalitě jsme měli možnost studovat šíření paratuberkulózy mezi domácími a divoce žijícími přežvýkavci (Pavlík aj., 1999e). V prosinci roku 1992 bylo nakoupeno z Maďarska (původně skot importovaný do Maďarska z Francie) 19 jalovic plemene Charolais. Jedna mladá jalovice narozená počátkem roku unikla ze stáje v listopadu 1993 a do května 1994 (7 měsíců) se pohybovala ve volné přírodě v okruhu 15 až 20 km. Při odchytu jevila příznaky vyhublosti a průjmu. Při došetření byla zjištěna jako příčina klinických příznaků paratuberkulóza způsobená kmenem RFLP typu B-C1.

Na základě této skutečnosti bylo v letech 1995 až 1996 vyšetřeno na paratuberkulózu celkem 84 kusů střílené spárkaté zvěře pocházející ze 43 různých lokalit tohoto okresu. Tyto jednotlivé lokality byly rovnoměrně rozptýleny po celém okrese, takže vzorky byly dodány nejen z oblasti výskytu jelení zvěře, ale i z oblastí typických pro výskyt srncí zvěře. *M. a. paratuberculosis* stejného RFLP typu B-C1 bylo izolováno od jednoho jelena evropského. Od srnců obecných byly izolovány čtyři kmény: tři kmény RFLP typu B-C1 a jeden kmen jiného RFLP typu B-C9. Z anamnestických

údajů vyplynulo, že tři divocí přežvýkavci (jeden jelen a dva srnci) infikovaní kmény RFLP typu B-C1 byli uloveni v oblasti, kde se sedm měsíců pohybovala výše uvedená jalovice infikovaná stejným RFLP typem kmene. Od dvou srnců ulovených mimo tuto oblast, u nichž se nepodařilo přesně zjistit zdroj infekce, byly izolovány kmény RFLP typů B-C1 a B-C9 (Pavlík aj., 1999e).

Při následující depistáži v letech 1997 až 1998 v celé České republice rozdělené na 74 okresů bylo vyšetřeno 596 kusů spárkaté zvěře z více než 90 % okresů. *M. a. paratuberculosis* bylo izolováno od 23 zvířat z volné přírody, jeleních farem a obor pocházejících z jiných 14 okresů. V jedné lokalitě byla prokázána identita izolovaných kmenů určitého RFLP typu u srnce a společně se pasoucího stáda skotu plemene Limousine. Stejný záchyt se podařil v jiné lokalitě u daňka skvrnitého, infikovaného kmenem stejného RFLP typu, kterým bylo v téže lokalitě infikováno stádo skotu plemene Holstein (Pavlík aj., 1999e).

4.3.8. Identifikace kmenů *M. a. paratuberculosis* od pacientů s Crohnovou chorobou

Kmény *M. a. paratuberculosis* od sedmi pacientů s Crohnovou chorobou z Holandska, Austrálie a USA byly RFLP typů B-C1 a B-C5. Naproti tomu kmen Fryba izolovaný poprvé v České republice v roce 1993 od pacienta s Crohnovou chorobou byl RFLP typu A-C10. Z epidemiologického hlediska je velice důležité zjištění, že kmény stejného RFLP typu A-C10 byly izolovány z 10 farem skotu a ovcí infikovaných paratuberkulózą v okruhu 70 km od bydliště pacienta (Pavlík aj., 1994). Druhý kmen Michaela izolovaný v jiné části České republiky byl RFLP typu D-C12, který se vyskytuje zejména u skotu v České republice (Pavlík aj., 1999f). Tyto výsledky tedy naznačují fakt, že i člověk je v kontaktu s kmény *M. a. paratuberculosis*, které se vyskytují v dané oblasti a které je možné z jeho střešního traktu izolovat.

4.4. Molekulární epidemiologie u kmenů komplexu *M. avium*

V epidemiologických studiích bylo využito především metod PFGE (Mazurek aj., 1993), REA (Wards aj., 1991) a RFLP se specifickými sondami (van Soelingen aj., 1991, 1993, 1998; McFadden, 1987; Garzelli, 1997). Při diferenciaci kmenů komplexu *M. avium* jsou využívány především IS, které se vyskytují na genomu v různém počtu kopií a jsou odlišně lokalizovány: IS901 (Kunze aj., 1991), IS902 (Moss aj., 1992), IS1110 (Hernandez aj., 1994), IS1141 (Via a Falkinham, 1995), IS1245 (Guerrero aj., 1995), IS1311 (Roiz aj., 1995) a IS1613 (Bull aj., 1998).

4.4.1. RFLP u kmenů komplexu *M. avium* s IS901

U kmenů komplexu *M. avium* virulentních pro kuřice (sérotyp 1 až 3), které jsou z veterinárního hlediska

nejvýznamnější, je nejčastěji využíváno při studiu epidemiologie přítomnosti IS901 (Kunze aj., 1991, 1992; Pavlík aj., 1999c). Kunze aj. (1991) ve své studii poprvé sledovali distribuci IS901 v kmenech ptáků a dalších zvířat pomocí metody RFLP po štěpení RE *PvuII*. Kmeny, u kterých byla sekvence detekována, označili jako typ A/I a kmeny bez IS901 byly označeny jako typ A.

4.4.1.1. Využití IS901 při studiu epizootologie a epidemiologie

V naší laboratoři jsme sledovali homogenitu/heterogenitu virulentních kmenů komplexu *M. avium* pro kůřice v populaci zvířat a ptáků v České republice a na Slovensku. Za tímto účelem jsme zavedli typizaci kmenů výše uvedenou metodou s využitím paralelního štěpení RE *PstI* a *PvuII*. Každý kmen byl charakterizován nejprve RFLP typem po štěpení s RE *PvuII* (označeno písmeny) a následně s RE *PstI* (označeno číslem) např.: A17, B1 atd. Zjistili jsme celkem 28 různých RFLP typů (Dvorská aj., 1999).

4.4.1.2. RFLP analýza sérotypových kmenů

Při vyšetření sérotypových kmenů všech 28 sérotypů komplexu *M. avium* byla prokázána IS901 pouze u devíti kmenů sérotypů 1, 2 a 3 poskytnutých ze čtyř různých laboratoří. Jejich vyšetřením metodou RFLP bylo zjištěno šest různých RFLP typů. Mezi dvěma stejně označenými kmeny poskytnutými z různých laboratoří nebyly zjištěny rozdíly, což svědčí po více než 30 letech o jejich identitě. Nebyl zjištěn vztah mezi sérotypem kmene a jeho RFLP typem, protože u sérotypových kmenů serotypu 2 byly zjištěny dva a u serotypu 3 celkem tři různé RFLP typy (Dvorská aj., 1999).

4.4.1.3. RFLP analýza terénních kmenů

Při epidemiologické studii byly od prasat testovány terénní kmeny komplexu *M. avium* s IS901 z 18 farem 12 okresů České republiky a z 15 farem 11 okresů Slovenské republiky. Mezi kmeny pocházejícími z různých lokalit byla pozorována vysoká heterogenita. Z toho vyplývá, že zdroje infekce byly v různých chovech různé. Pro posouzení homogenity/heterogenity kmenů v infikovaném chovu jsme vybrali dva chovy prasat v České republice. V obou případech se nám podařilo prokázat výskyt stejných RFLP typů v rámci jedné farmy (absolutní homogenita kmenů). Z těchto výsledků tedy vyplývá skutečnost, že po zavlečení kmene jednoho RFLP typu do chovu došlo v obou těchto stádech k jeho následnému rozšíření. Naproti tomu z každého jednotlivého stáda prasat byl izolován jiný RFLP typ kmene. Na Slovensku byly výsledky typizace kmenů obdobné. Jen v působnosti jedné Okresní veterinární správy byly zjištěny kmeny stejného RFLP typu ve dvou různých farmách. Později bylo ale zjištěno, že tyto farmy byly spolu provozně spojeny (Dvorská aj., 1999).

Vyšetřeny byly i humánní kmeny komplexu *M. avium*, které obsahovaly IS901. Dva kmeny pocházely od pacientů s HIV/AIDS a jeden kmen byl izolován od pacienta bez HIV/AIDS infekce. RFLP analýzou byl prokázán identický RFLP typ (P11) u pacientů s HIV/AIDS infekcí a odlišný RFLP typ (D9) u pacienta bez HIV/AIDS (Dvorská aj., 1999).

4.4.2. RFLP u kmenů komplexu *M. avium* s IS1245

Po rehybridizaci IS901 pozitivních kmenů komplexu *M. avium* se sondou IS1245 byly získány RFLP typy pouze s malým počtem proužků se stejným motivem. Proto nebylo možné u těchto kmenů využívat sondu IS1245 ke studiu molekulární epizootologie (Dvorská aj., 1999). Naopak však u 30 kmenů bez IS901 byly se sondou IS1245 získány RFLP typy se šesti až 20 kopiemi (dosud nepublikované výsledky). U těchto 30 kmenů byla zjištěna vysoká heterogenita RFLP typů po štěpení s oběma RE *PstI* a *PvuII*. Pro posouzení korelace RFLP typů kmenů s epizootologickými údaji jsme pro vyšetření s RE *PstI* vybrali 30 kmenů z 21 infikovaných stád prasat v 16 okresech. Přitom při vyšetření 15 kmenů z 15 stád prasat byla zjištěna stoprocentní heterogenita kmenů, to znamená, že z každého chovu byl izolován jiný RFLP typ kmene.

Pro posouzení homogenity kmenů v jednotlivých infikovaných stádech prasat bylo ze šesti chovů šesti okresů vyšetřeno po více než jednom kmeni. Ve třech těchto stádech s vyšetřenými dvěma kmeny byla zjištěna jejich homogenita. Ve dvou zbývajících stádech však byla zjištěna směs dvou RFLP typů kmenů a ve třetím chovu s identifikovanými třemi kmeny dokonce směs tří RFLP typů kmenů. Z výsledků je tedy zřejmé, že zdroje těchto kmenů komplexu *M. avium* bez IS901, ale s FR300 bp jsou v chovech prasat pravděpodobně různé.

4.4.3. PCR s primery odvozenými z IS1110

V naší laboratoři bylo vyšetřeno na přítomnost IS1110 27 izolátů od pacientů s HIV/AIDS a 36 izolátů od pacientů bez HIV/AIDS. Její přítomnost byla detekována ve 37 % u HIV/AIDS pozitivních (10/27) a v 50,5 % u HIV/AIDS negativních pacientů (11/36). Tyto kmeny byly rovněž testovány metodou PCR na přítomnost FR1110, která sekvenci ohraničuje. Ve 14,8 % případů byla FR1110 zjištěna u HIV/AIDS pozitivních a v 50,5 % případů u pacientů bez HIV/AIDS (výsledky nepublikovány).

5. ZÁVĚR

Genomy všech organismů obsahují mnoho různých transpozice schopných elementů. Tyto segmenty byly poprvé objeveny v genomu kukuřice (*Zea mays*) McClintockovou (1951). Nejintenzivněji však byly studovány na eukaryotickém modelu *Drosophila*, kde je

dnes známo více než 30 různých typů těchto elementů. Transpoziciční elementy se podílejí na tvorbě diversity organismů, čímž se účastní evoluce. Evoluce genomu může být tedy urychlena inzercí nebo excizí transpozicičního elementu do strukturního genu, který se mutačně změní. Proto přítomnost transpozonu v genomu může být jedním z faktorů, které vyvolávají změny v genetické informaci genomu. *IS* však většinou obsahují jen gen (geny) pro svou vlastní transpozici. Jedná se tedy o tzv. „parazitické“ DNA elementy, které jsou udržovány v bakteriální populaci i přes „protiútok“ přirozené selekce.

Druhově specifický výskyt *IS* je využíván k identifikaci bakterií pomocí metod molekulární genetiky. Stanovení počtu a polohy těchto *IS* na genomu je pak využíváno hlavně v metodě RFLP, která umožňuje diferenciaci patogenních kmenů. Právě v mykobakteriologii umožnil objev a využití těchto inzerčních sekvencí rozlišit kmeny jednotlivých druhů do různých RFLP typů. Tím se po více než 100 letech od objevu *M. tuberculosis* v roce 1882 Robertem Kochem daří odpovědět na mnoho nezodpovězených otázek z patogeneze, epizootologie i epidemiologie. Stejně tomu je u mykobakteriálních infekcí způsobovaných jinými druhy mykobakterií nejen u člověka, ale i u zvířat, ptáků a dalších živočichů.

Poděkování

Děkujeme za připomínky MUDr. I. Hynčicové ze Státního zdravotního ústavu v Praze, Mgr. P. Švástové a Ing. Z. Rozsypalové z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně.

LITERATURA

Bauerfeind R., Benazzi S., Weiss R., Schliesser T., Willems H., Bajler G. (1996): Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element *IS900*. J. Clin. Microbiol., 27, 1617–1621.

Bono M., Jemmi T., Bernasconi C., Burki D., Telenti A., Bodmer T. (1995): Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. Appl. Environ. Microbiol., 61, 371–373.

Bruton C. J., Chater K. F. (1987): Nucleotide sequence of *IS110*, an insertion sequence of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Nucleic. Acids. Res., 15, 7053–65.

Bull T. J., Pavlik I., Garcia M. J., Švástová P., Sumar N., Hermon-Taylor J. (1998): A new insertion sequence (*IS1613*) highly related to *IS900*, found in *Mycobacterium avium* complex. Paratub. Newslett., 10, 29.

Cave M. D., Eisenach K. D., McDermott P. F., Bates J. H., Crawford J. T. (1991): *IS6110*: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. Mol. Cell. Probes, 5, 73–80.

Cirillo J. D., Barletta R. G., Bloom B. R., Jacobs W. R. (1991): A novel transposon trap for mycobacteria: isolation and characterization of *IS1096*. J. Bacteriol., 173, 7772–7780.

Chandler M., Fayet O. (1993): Translation frameshifting in the control of transposition in bacteria. Mol. Microbiol., 7, 497–503.

Collins D. M., Gabric D. M., DeLisle G. W. (1990): Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. J. Clin. Microbiol., 28, 1591–1596.

Collins D. M., Stephens D. M. (1991): Identification of an insertion sequence, *IS1081*, in *Mycobacterium bovis*. FEMS Microbiol. Lett., 83, 11–16.

Collins D. M., Hilbink F., West D. M., Hosie B. D., Cooke M. M., DeLisle G. W. (1993): Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterization and the polymerase chain reaction. Vet. Rec., 133, 599–600.

Cousins D. V., Williams S. N., Ross B. C., Ellis T. M. (1993): Use of a repetitive element isolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridization studies with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. Vet. Microbiol., 37, 1–17.

De Lisle G. W., Collins D. M., Huchermeyer H. A. K. (1992): Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. Onderstepoort J. Vet. Res., 59, 163–165.

De Lisle G. W., Yates G., Collins D. M. (1993): Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Vet. Diagn. Invest., 5, 567–571.

Dixon R., Jamarat K., Anderson S., Roberts C. (1995): Amplification by polymerase chain reaction (PCR) of a *Mycobacterium tuberculosis*-specific insertion element from ancient human bone. Poster, summer vac. scholarship, Welcome Trust, Bradford.

Doran T., Tizard M., Millar D., Ford J., Sumar N., Loughlin M., Hermon-Taylor J. (1997): *IS900* targets translation initiation signals in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to facilitate expression of its *hed* gene. Microbiology, 143, 547–552.

Dvorská L., Švástová P., Bartl J., Parmová I., Melichárek I., Očepek M., Van Soelingen D., Pavlik I. (1999): DNA fingerprinting s *IS901* a *IS1245* a studium epidemiologie infekcí *IS901+* kmeny komplexu *Mycobacterium avium* izolovaných od zvířat, ptáků a lidí. Under preparation.

Dwyer R., Richardson D., Ross M. W., Wodak A., Miller M. E., Gold J. (1994): A comparison of HIV risk between women and men who inject drugs. AIDS Educ. Prev., 6, 379–89.

England P. M., Wall S., McFadden J. (1991): *IS900*-promoted stable integration of a foreign gene into mycobacteria. Mol. Microbiol., 8, 2047–2052.

Eisenach K. D., Cave M. D., Bates J. H., Crawford J. T. (1990): Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect. Dis., 161, 977–981.

- Eisenach K. D., Siffrid M. D., Cave M. D., Bates J. H., Crawford J. T. (1991): Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **144**, 1160–1163.
- Eisenach K. D., Cave M. D., Crawford J. T. (1993): PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Pershing D. H., Smith T. F., White T. J.: *Diagnostic Molecular Microbiology*. Washington D. C., American Society for Microbiology. 191–196.
- Fang Z., Forbes K. J. (1997): A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 preferential locus (*ipl*) for insertion into the genome. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 479–481.
- Garcia M. J., Guilhot C., Lathigra B., Menendez M. C., Domenech P., Moreno C., Gicquel B., Martin C. (1994): Insertion sequence IS1137, a new IS3 family element from *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, **140**, 2821–2828.
- Garzelli C., Lari N., Nguon B., Cavallini M., Pistello M., Falcone G. (1997): Comparison of three restriction endonucleases in IS1245-based RFLP typing of *Mycobacterium avium*. *J. Med. Microbiol.*, **46**, 933–939.
- Green E. P., Tizard M. L., Moss M. T., Thompson J., Winterbourne D. J., McFadden J. J., Hermon-Taylor J. (1989): Sequence and characteristic of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucl. Acid. Res.*, **22**, 9063–9087.
- Guerrero C., Bernasconi C., Burki D., Bodmer T., Telenti A. (1995): A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 304–307.
- Guilhot C., Gicquel B., Davies J., Martin C. (1992): Isolation and analysis of IS6120, a new insertion sequence from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.*, **6**, 107–113.
- Havelková M., Hynčicová I., Kubín M., Kaustová J., Švecová Z. (1999): Molekulárně biologické metody v diagnostice a epidemiologii tuberkulózy. *Klin. Mikrobiol. Inf. Lék.*, v tisku.
- Hernandez Perez M., Fomukong N. G., Hellyer T., Brown I. N., Dale J. W. (1994): Characterisation of IS1110, a highly mobile genetic element from *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.*, **12**, 717–724.
- Horváth R., Horáčková L., Benešová L., Bartoš M., Votava M. (1997): Detekce DNA specifické pro *Mycobacterium tuberculosis* v archeologických materiálech metodou polymerázové řetězové reakce. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, **46**, 9–12.
- Kremer K., Van Soolingen D., Půtová I., Kubín M. (1996): Use of IS6110 DNA fingerprinting in tracing man-to-man transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Czech Republic. *Centr. Europ. J. Publ. Hlth.*, **4**, 3–6.
- Kubín M., Riley L. W., Havelková M., Poltoratskaja N., Kočová A. (1998): Molecular epidemiology of tuberculosis in Prague: An analysis by restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Inf. Dis.*, **2**, 155–158.
- Kubín M., Havelková M., Hynčicová I., Mezenský L., Sklenář V., Kremer K., Van Soolingen D. (1999a): Mikroepidemie tuberkulózy v Jihozápadním kraji. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, **48**, 47–51.
- Kubín M., Havelková M., Hynčicová I., Švecová Z., Kaustová J., Kremer K., van Soolingen D. (1999b): Molekulární epidemiologie polyresistentní tuberkulózy. *Stud. Pneumol. Phtiseol.*, v tisku.
- Kunze Z. M., Wall S., Appelberg R., Silva M. T., Portaels F., McFadden J. J. (1991): IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.*, **5**, 2265–2272.
- Kunze Z. M., Portaels F., McFadden J. J. (1992): Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2366–2372.
- Mahillon J., Chandler M. (1998): Insertion sequence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 725–774.
- Martin C., Timm J., Rauzier J., Gomez-Lus R., Davies J., Gicquel B. (1990): Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature*, **345**, 739–743.
- Mazurek G. H., Cave M. D., Eisenach K. D., Wallace R. J., Bates J. H., Crawford J. T. (1991): Chromosomal DNA fingerprinting patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2030–2033.
- Mazurek G. H., Hartman S., Zhang Y., Brown B. A., Hector J. S., Murphy D., Allace R. J. (1993): Large DNA restriction fragment polymorphism in the *Mycobacterium avium* – *M. intracellulare* complex: a potential epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 390–394.
- McAdam R. A., Hermans P. W. M., Van Soolingen D., Zaninuddin Z. F., Catty D., Van Embden J. D., Dale J. W. (1990): Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol. Microbiol.*, **4**, 1607–1613.
- McClintock B. (1951): Chromosome organization and gene expression. *Cold Spring Harbor Quant. Biol.*, **16**, 13–47.
- McFadden J. J., Butcher T. D., Chiodini R. J., Hermon-Taylor J. (1987): Determination of genome size and DNA homology between an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease and other mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 211–214.
- Meissner G., Anz W. (1977): Sources of *Mycobacterium avium* complex infection resulting in human diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **116**, 1057–1064.
- Moss M. T., Malik Z. P., Tizard M. L. V., Green E. P., Sanderson J. D., Hermon-Taylor J. (1992): IS902, an insertion element of the chronic-enteritis-causing *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 139–145.
- Pavlas M., Hanzlíková M., Štika V., Pavlík I. (1997): Výskyt, diagnostika a tlumení paratuberkulózy skotu v českých zemích a na Slovensku. *Slov. Vet. Čas.*, **4**, 184–187.
- 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: *Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis*, ISBN 0-9633043-2-1, July 17–21, Cambridge, UK. 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: Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis, ISBN 0-9633043-3-x (pbk.), September 29–October 4, Madison, Wisconsin, USA, 202–211.
- Pavlík I., Bartl J., Horváthová A., Rychlík I. (1999a): Restriction-fragment-length polymorphisms with the probe *IS900* in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J. Bacteriol. Meth., submitted.
- Pavlík I., Bartl J., Dvorská L., Švástová P., Havelková M., Šlosárek M. (1999b): Současný zdravotní význam a identifikace kmenů komplexu *Mycobacterium avium* u zvířat a lidí. Klin. Mikrobiol., 3, 5–12.
- Pavlík I., Švástová P., Bartl J., Dvorská L., Rychlík I. (1999c): Correlation between the presence of *IS901* and the virulence of the *Mycobacterium avium* complex strains for birds and the distribution of *IS901* in strains isolated from birds, animals, human and environment. J. Clin. Microbiol., submitted.
- Pavlík I., Bölske G., Englund S., Dvorská L., Du Maine R., Švástová P., Viske D., Parmová I., Bažant J. (1999d): Use of DNA fingerprinting for epidemiological studies of paratuberculosis in Sweden and the Czech Republic. Vet. Microbiol., submitted.
- Pavlík I., Bartl J., Horváthová A., Dvorská L., Mátllová L., Fischer O., Du Maine R., Rozsypalová Z. (1999e): Study of spreading *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of different DNA fingerprints from farm to wild ruminants and survey performed in wild ruminants in the Czech Republic in the period 1995–1998. Vet. Microbiol., submitted.
- Pavlík I., Horváthová A., Dvorská L., Švástová P., Du Maine R., Fixa B., Rychlík I. (1999f): Homogeneity/heterogeneity of strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: analysis of results and the correlation between RFLP-type of a strain and its origin (animal, environment, man). Vet. Microbiol., submitted.
- Piening C., Anz W., Meissner G. (1972): Serotyp Bestimmungen und ihre Bedeutung für epidemiologische Untersuchungen bei der Schweinetuberkulose in Schleswig-Holstein. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 79, 85–93.
- Poulet S., Cole S. T. (1995): Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. Arch. Microbiol., 163, 87–95.
- Ritacco V., Kremer K., Van der Laan T. M., Pijnenburg J. E., De Haas P. E. W., Van Soolingen D. (1998): Use of *IS901* and *IS1245* in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. Int. J. Tuberc. Lung. Dis., 2, 242–251.
- Roiz M. P., Palenque E., Guerrero C., Garcia M. (1995): Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing *Mycobacterium avium* strains. J. Clin. Microbiol., 33, 1389, 1391.
- Rychlík I., Pavlík I. (1997): Molecular genetics methods in identification and differentiation of bacterial strains and species. Vet. Med. – Czech, 42, 111–123.
- Saedler H., Starlinger P. (1967): 0 degree mutations in the galactose operon in *E. coli*. I. Genetic characterization. Mol. Gen. Genet., 100, 178–89.
- Salo W. L., Aufderheide A. C., Buikstra J., Holcomb T. A. (1994): Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-columbian Peruvian mummy. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 91, 2091–2094.
- Skuce R. A., Brittain D., Hughes M. S., Neill S. D. (1996): Differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals by DNA typing. J. Clin. Microbiol., 34, 2469–2474.
- Small P. M., Hopewell P. C., Singh S. P. (1994): The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N. Engl. J. Med., 330, 1703–1709.
- Sneath P. H. A., Sokal R. R. (1973): Numerical Taxonomy. San Francisco, Freeman Co.
- Tabet S. R., Goldbaum G. M., Hooton T. M., Eisenach K. D., Cave M. D., Nolan C. M. (1994): Restriction fragment length polymorphism analysis detecting a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with human immunodeficiency virus. J. Infect. Dis., 169, 189–192.
- Thierry D., Cave M. D., Eisenach K. D., Crawford J. T., Bates J. H., Gicquel B., Guesdon J. L. (1990): *IS6110*, an *IS*-like element of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucl. Acids Res., 18, 188.
- Thorel M. F., Krichevsky M., Levy-Frebault V. V. (1990): Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int. J. Syst. Bact., 40, 254–260.
- Van Embden J. D. A., Cave M. D., Crawford J. T., Dale J. W. (1993): Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting. Recommendations for a standard methodology. J. Clin. Microbiol., 31, 406–409.
- Van Soolingen D., Hermans P. W. M. (1995): Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. Eur. Respir. J., 8, 649–656.
- Van Soolingen D., Hermans P. W. M., De Haas P. E. W., Soll D. R., Van Embden J. D. A. (1991): The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains; evaluation of *IS*-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol., 29, 2578–2586.
- Van Soolingen D., Hermans P. W., De Haas P. E. W., Van Embden, J. D. A. (1992): Insertion element *IS1081*-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. J. Clin. Microbiol., 30, 1772–1777.
- Van Soolingen D., De Haas P. E. W., Hermans P. W. M., Van Embden J. D. A. (1993): DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. Meth. Enzym., 235, 196–205.
- Van Soolingen D., De Haas P. E. W., Haagsma J., Eger T., Hermans P. W. M., Ritacco V., Alito A., Van Embden J.

- D. A. (1994): Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 2425–2433.
- Van Soolingen D., Bauer J., Ritacco V., Leao S. C., Pavlik I., Vincent V., Rastogi N., Gori A., Bodmer T., Garzelli C., Garcia M. J. (1998): *IS1245* restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 3051–3054.
- Via L. E., Falkinham J. O. (1995): *IS1141* and colonial variation in *Mycobacterium intracellulare*. Unpublished. ACCESSION L10239.
- Wards B. J., DeLisle G. W., Yates G. F., Dawson D. J. (1991): Characterization by restriction endonuclease analysis and seroagglutination of strains of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* obtained from farmed deer. *Am. J. Vet. Res.*, 52, 197–201.
- Watson J. D., Crick F. H. C. (1953): A structure for deoxy-ribose nucleic acid. *Nature*, 25, 737–738.
- 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.
- Wolinsky E., Schaeffer W. B. (1973): Proposed numbering scheme for mycobacterial serotypes by agglutination. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 23, 182–183.
- Yang M., Ross B. C., Dwyer B. (1993): Identification of an insertion sequence-like element in a subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 2074–2079.
- Zhang Y., Mazurek G. H., Cave M. D., Eisenach K. D., Pang Y., Murphy D. T., Wallace R. J. (1992): DNA polymorphisms in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analyzed by pulsed-field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. *Clin. Microbiol.*, 30, 1551–1556.

Received: 99-01-19

Accepted after corrections: 99-06-02

Kontaktní adresa:

MVDr. Ivo Pavlík, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: pavlik@vri.cz, http://www.vri.cz

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION

Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic

Fax: (00422) 24 25 39 38

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Czech Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with long summaries in English or in English language with summaries in Czech or Slovak.

Subscription to these journals should be sent to the above-mentioned address.

Periodical	Number of issues per year
Rostlinná výroba (Plant Production)	12
Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba)	12
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12
Journal of Forest Science	12
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4
Plant Protection Science (Ochrana rostlin)	4
Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění)	4
Zahradnictví (Horticultural Science)	4
Czech Journal of Food Sciences (Potravinařské vědy)	6

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 zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce imprimované 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 dvojité 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, nepodlépají 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 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 citace. Je vhodné je (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 dedukce, 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 prvního autora.

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 PSČ, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

Úplné znění pokynů pro autory s dodatky najdete na URL adrese <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>

For full text of instruction for authors see <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>

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 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.

VETERINARY MEDICINE – CZECH

Volume 44, No. 8, August 1999

CONTENTS

Karpíšková R., Holasová M.: The use of immunomagnetic separation in detection of salmonella and listeria from foodstuffs.....	225
SHORTCOMMUNICATION	
Šutiak V., Šutiaková I., Rosival I.: The interaction of two forms of glutamic acid with ammonia in sheep (in English).....	229
REVIEW ARTICLE	
Dvorská L., Havelková M., Bartoš M., Bartl J., Pavlík I.: Insertion sequences of mycobacteria and their use in the study of epidemiology of mycobacterial infections.....	233

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 44, č. 8, Srpen 1999

OBSAH

Karpíšková R., Holasová M.: Využití metody imunomagnetické separace při stanovení salmonel a listerií v potravinách.....	225
KRÁTKÉ SDĚLENÍ	
Šutiak V., Šutiaková I., Rosival I.: Interakcia dvoch foriem kyseliny glutámovej s amoniakom u oviec.....	229
PŘEHLED	
Dvorská L., Havelková M., Bartoš M., Bartl J., Pavlík I.: Inzerční sekvence u mykobakterií a jejich využití při studiu epidemiologie mykobakteriálních infekcí.....	233