
B I PROSPECT

Devatenáctý ročník
Číslo 1/2009

Adresa společnosti: VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, tel.: 220 443 151, fax: 233 334 769, e-mail: Danka.Pokorna@vscht.cz, IČO 00570397, číslo účtu: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

**zakládajícího člena Českého svazu
vědeckotechnických společností
(ČSVTS)**

**a
člena „European Federation
of Biotechnology“ (EFB)**

Redakční rada

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor in Chief)

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Doc. Ing. Alena Čejková, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Milan Fránek, DrSc.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70, 621 32 Brno

Ing. Petra Lipovová, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Vladimír Vala
Ivax, Ostravská 29, 747 70 Opava

BIOPROSPECT

19th Volume
No. 1/2009

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech and Slovak Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both

research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. In each issue there will be advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared on the Czech and Slovak market, or are projected enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperations with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech and Slovak Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech and Slovak biotechnologists.

For more information contact the editorial board or directly:

Ladislav Fukal, Ph.D. (editor in chief)

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 445 137

e-mail: fukall@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

V r. 2009 oslaví naše střešní organizace **Český svaz vědeckotechnických společností (ČSVTS)**, jehož je naše Biotechnologická společnost zakládajícím členem, 20 let od svého založení. Toto výročí nám připomene konference, která se bude konat příští rok ve dnech 17. a 18. března 2010. Za těchto 20 let se ČSVTS (www.csvts.cz), jehož členy je 69 vědeckotechnických společností, vyprofiloval ve významného představitele a reprezentanta českých techniků a inženýrů, a to jak na národní, tak i mezinárodní úrovni. Podařilo se mu zkonzolidovat hospodářské výsledky Domů techniky a vytvořit pro své společnosti skvělé technické i finanční zázemí. Podrobné zhodnocení jeho činnosti jistě provede zmíněná konference, ale již nyní lze říci, že uplynulá léta byla velmi úspěšná, i když podmínky pro jeho činnost nebyly vždy lehké.

Velkou událostí v oblasti biotechnologie bylo jistě již **13. Mezinárodní biotechnologické symposium, konané pod záštitou IUPACu, v čínském Dalianu od 12. do 17. 10. 2008.** Symposium se poprvé konalo na asijském kontinentě a podle bohaté účasti z asijských zemí jistě podpořilo zájem o biotechnologie v této oblasti. I za českou účast na symposiu (15 účastníků) se nemusíme stydět. Všichni čeští účastníci přednesli přednášky nebo prezentovali poster. Abstrakta všech sdělení naleznou zájemci v „Journal of Biotechnology“, Vol. 137, Issue 3S (ISSN 0168-1656), případně na CD, kteří dostali účastníci symposia. Čtyřletý interval těchto mezinárodních biotechnologických symposií byl zkrácen na 2 roky a pořadatelem IBS 2010 byla pověřena Itálie. Symposium se bude konat ve dnech v Rimini (www.ibs.2010.org) a předsedou organizačního výboru je p. Prof. Francesco Nicotra z milánské univerzity. Dovolte mi, abych Vás ještě upozornil na některé letošní události, které by Vás mohly zajímat. Předně Vás co nejsrdečněji zvu na náš již tradiční **seminář „Novinky v oblasti genetických modifikací“**, který se bude konat v úterý dne 28. dubna 2009 v ÚOChB AV ČR, v.v.i. v 9 hod. Vstup je jako vždy volný a pro účastníky připravujeme materiály s přednesenými přednáškami. Mnohé z Vás jistě bude zajímat **14th European Congress on Biotechnology, který se koná ve španělské Barceloně od 13. do 16. 9. 2009** pod heslem „Symbiosis“ of Science, Industry and Society. Je pořádán EFB (Evropskou biotechnologickou federací). Podrobnosti na www.ecb14.eu. Dále bych Vás chtěl upozornit na mezinárodní kongres a výstavu „**Forum**

Life Science“ pořádané 18. a 19. 3. 2009 v Mnichově (Na programu jsou 3 tematické okruhy: Pharma Development, Food and Nutrition a Industrial Biotechnology). Více na www.bayern-innovativ.de. Do evropských biotechnologických akcí patří i **Biotechnika 2009 Hannover** (konference a výstava), která se koná 6. – 8. 10. 2009 v Hannoveru (viz www.biotechnica.de). Zde je možné vystavovat ve společném českém stánku. Informace zájemcům podá p. Ing. Eva Václavíková (tel.: 220 510 057 nebo 220 517 837, e-mail: info@hf-czechrepublic.com), resp. na www.hf-czech-republic.com a www.czechtrade.cz.

Opakovaně Vás zvu i na evropský biotechnologický kongres **FEBS 2009**, který se koná v Praze 4. – 9. července 2009 (informace na www.febs2009.org).

Velice rád Vás informuji o tom, že z iniciativy Biotechnologického ústavu AV ČR byla založena **Asociace biotechnologických společností** o jejímž profilu a záměrech informuje v tomto čísle publikovaný příspěvek.

Evropská komise požádala nezávislou organizaci European Food Safety Authority (EFSA) o předložení návrhu aktualizovaného postupu při hodnocení vlivu GMO na životní prostředí při uvolnění GM plodin do prostředí, a to do března 2010. Někteří vědečtí pracovníci přišli s iniciativou soustředit české zkušenosti do „Bílé knihy“. Podrobnější informace přináší příspěvek p. prof. Drobníka. Zájemci o spolupráci v tomto směru obraťte se autory projektu.

Jako obvykle jsme pro Vás vybrali několik přehledných článků na zajímavá témata.

Abychom měli prostředky na naší činnost, zejména vydávání Biopropectu, dovoluji si Vám připomenout členskou povinnost platit každý rok příspěvky. Poštou dostanete složenky, resp. faktury pro institucionální členy a zaplacení neodkládejte.

Závěrem bych rád poděkoval všem čtenářům našeho bulletinu za přízeň v r. 2008 a popřál jim mnoho úspěchů v soukromém i profesním životě po celý rok 2009. Těšíme se na další spolupráci, Vaše podněty a připomínky.

Laskavě sledujte aktuální informace na našem webu v rubrice „Aktuality“.

Váš

Jan Káš

**Biotechnologická společnost
Fakulta potravinářské a biochemické technologie VŠCHT
Ministerstvo životního prostředí – Projekt UNEP/GEF
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.
Ústav chemických procesů AV ČR, v.v.i.**

si Vás dovoluji pozvat na 3. seminář

Novinky v oblasti genetických modifikací

organizovaný v rámci projektu UNEP/GEF
„Support for the Implementation of the Draft National Biosafety Framework
for the Czech Republic“
a VZ „Teoretické základy potravinářských a biochemických technologií“

**a konaný v úterý 28. dubna 2009
v přednáškové síni ÚOCHB AV ČR,
Praha 6, Flemingovo náměstí č. 2**
(tramvají č. 20 do stanice Lotyšská, autobusem č. 131 do stanice Zelená
nebo pěšky od stanice metra Dejvická kolem VŠCHT)

PROGRAM:

- 9,15 Registrace
- 9,30 **J. Káš**, VŠCHT Praha: Úvodní slovo
- 9,45 **M. Fusek**, Life Science Capital: Genové inženýrství ve farmacii
- 10,15 **S.A. Ripp**, The University of Tennessee:
Bioluminiscent bioreporters for monitoring of environmental pollution
- 10,45 Přestávka
- 11,00 **J. Ovesná, J. Hodek a L. Kučera**, VÚRV Praha:
Nové postupy pro identifikaci GMO – využití DNA arrays
- 11,30 **T. Stopka**, Ústav patologické fyziologie 1.LF UK, Praha:
Využití transgenních myší pro studium lidských onemocnění
- 12,00 Diskuse a závěr semináře

Vstup je volný

Účastníci obdrží materiály s přednesenými přednáškami

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.
VŠCHT Projekt

Za organizátory semináře:
Ing. Milena Roudná, CSc.
UNEP/GEF

Ing. Eva Pichová, CSc.
ÚOCHB AV ČR



BRUSEL HOSTIL BRNĚNSKÉ UNIVERZITNÍ PROJEKTY

Věda a výzkum v Brně mají budoucnost. Tak by se dalo volně přeložit téma semináře „Research and Development and Universities as Engines of Regional Competitiveness“, který v Bruselu 3. 12. 2008 pořádaly největší brněnské univerzity, Zastoupení Jihomoravského kraje při EU a město Brno.

Hlavním cílem semináře bylo představit bruselským úředníkům nejvýznamnější projekty brněnských univerzit, vznikající za podpory evropských strukturálních fondů. V úvodu posluchače pozdravil velvyslanec rada Miroslav Fuchs, univerzity reprezentoval Michal Kotoul, prorektor pro tvůrčí rozvoj Vysokého učení technického v Brně.

Představitelé bruselské administrativy se na semináři blíže seznámili s výzkumným projektem CEITEC, doposud největší plánovanou investicí do vědy a výzkumu v Brně. Dále byl prezentován projekt NETME Centre, připravovaný Fakultou strojního inženýrství Vysokého učení technického a projekt RECETOX, jež zaštiťuje Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity.

Podle zúčastněných představitelů politické reprezentace Brna a Jihomoravského kraje se jedná

o jedinečnou příležitost k posílení rozvoje regionu. Náměstek primátora Oliver Pospíšil k tomu řekl: „*Inovace jsou zásadní podmínkou pro růst konkurenceschopnosti Brna a významný podíl na posílení této oblasti rozvoje města bude mít i CEITEC, společný univerzitní projekt.*“ Radní Jihomoravského kraje Miloš Šifalda a Jiří Janda zdůraznili dlouhodobou a soustavnou práci kraje na přípravě souvisejících strategických dokumentů a institucí jako jsou Regionální inovační strategie a Jihomoravské inovační centrum.

Mezi účastníky semináře zavítal i poslanec Evropského parlamentu Petr Duchoň, podle nějž byla tato akce konečně první ucelenou prezentací vědecko-výzkumného potenciálu vysokých škol z celé ČR. Ocenil tak dlouhodobou a systematickou práci univerzit přispívající k posilování významu a úspěšnosti celého jihomoravského regionu.

Zdroj: CEITEC s.r.o., www.ceitec.cz

BRUSEL HOSTIL BRNĚNSKÉ UNIVERZITNÍ PROJEKTY

Věda a výzkum v Brně mají budoucnost. Tak by se dalo volně přeložit téma semináře „Research and Development and Universities as Engines of Regional Competitiveness“, který v Bruselu 3. 12. 2008 pořádaly největší brněnské univerzity, Zastoupení Jihomoravského kraje při EU a město Brno.

Hlavním cílem semináře bylo představit bruselským úředníkům nejvýznamnější projekty brněnských univerzit, vznikající za podpory evropských strukturálních fondů. V úvodu posluchače pozdravil velvyslanec rada Miroslav Fuchs, univerzity reprezentoval Michal Kotoul, prorektor pro tvůrčí rozvoj Vysokého učení technického v Brně.

Představitelé bruselské administrativy se na semináři blíže seznámili s výzkumným projektem CEITEC, doposud největší plánovanou investicí do vědy a výzkumu v Brně. Dále byl prezentován projekt NETME Centre, připravovaný Fakultou strojního inženýrství Vysokého učení technického a projekt RECETOX, jež zaštiťuje Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity.

Podle zúčastněných představitelů politické reprezentace Brna a Jihomoravského kraje se jedná

o jedinečnou příležitost k posílení rozvoje regionu. Náměstek primátora Oliver Pospíšil k tomu řekl: „*Inovace jsou zásadní podmínkou pro růst konkurenceschopnosti Brna a významný podíl na posílení této oblasti rozvoje města bude mít i CEITEC, společný univerzitní projekt.*“ Radní Jihomoravského kraje Miloš Šifalda a Jiří Janda zdůraznili dlouhodobou a soustavnou práci kraje na přípravě souvisejících strategických dokumentů a institucí jako jsou Regionální inovační strategie a Jihomoravské inovační centrum.

Mezi účastníky semináře zavítal i poslanec Evropského parlamentu Petr Duchoň, podle nějž byla tato akce konečně první ucelenou prezentací vědecko-výzkumného potenciálu vysokých škol z celé ČR. Ocenil tak dlouhodobou a systematickou práci univerzit přispívající k posilování významu a úspěšnosti celého jihomoravského regionu.

Zdroj: CEITEC s.r.o., www.ceitec.cz

ČESKÝ INFORMAČNÍ SYSTÉM CARTAGENSKÉHO PROTOKOLU O BIOLOGICKÉ BEZPEČNOSTI

Česká republika jakožto smluvní strana Cartagenského protokolu o biologické bezpečnosti (dále jen „CPB“) má povinnost zajišťovat chod online informačního systému, jehož účelem je zejména usnadnit výměnu vědeckých, technických, environmentálních a právních informací týkajících se živých modifikovaných organismů a zkušeností s nimi. Provoz tohoto informačního systému byl zahájen v roce 2004, nicméně v letošním roce byla provedena rozsáhlá rekonstrukce s cílem jeho zpřehlednění a obsahového obohacení. V současnosti je aktualizovaná verze tohoto informačního systému dostupná v anglickém jazyce pod odkazem www.mzp.cz/biosafety.

Uvedená internetová stránka byla založena a spravována Ministerstvem životního prostředí, oddělením geneticky modifikovaných organismů, za podpory projektu UNEP/GEF „Project Building Capacity for Effective Participation in the Biosafety Clearing-House“. V současné podobě má 8 záložek (tj. „Home“, „National Contacts“, „Acts, Regulations and Guidelines“, „Decisions“, „Co-existence“, „Other Resources“, „Reporting“ a „Relevant Links“), z nichž každá obsahuje relevantní hypertextové odkazy a dokumenty s užitečnými informacemi ke stažení.

Úvodní informace o účelu stránek jsou uvedeny v záložce „Home“. Další záložka „National Contacts“ obsahuje detailní kontaktní informace o osobách a institucích zabývajících se biologickou bezpečností v České republice, tj. národní kontaktní osoba pro CPB, správní orgány a další instituce odpovědné za monitoring a kontrolu geneticky modifikovaných organismů.

Obsah záložky „Acts, Regulations and Guidelines“ naplňuje povinnost smluvních stran CPB uveřejnit v informačním systému všechny existující relevantní zákony, vyhlášky a metodiky vtahující se k implementaci CPB. K dispozici je proto anglický překlad zákona 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, se změnami a doplňky provedenými zákonem č. 346/2005 Sb., a vyhlášky 209 z roku 2004 o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty. V záložce je dále ke stažení dokument o postupech při hodnocení rizika prováděného v České republice a v neposlední řadě důležité informace pro žadatele o uvádění geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí či klinické zkoušky.

Velmi důležitá je záložka „Decisions“, v níž je možné nalézt rozhodnutí o povolení uvádění geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí v České republice. Od roku 2005 je na našem území testováno pět geneticky upravených plodin (nejvíce brambory a kukuřice, v malé míře také len, slivoň a tabák) s různými modifikacemi v rámci celkem 11 polních pokusů. Nedílnou součástí každého rozhodnutí je vždy mj. hodnocení rizika. Zveřejňování rozhodnutí prostřednictvím informačního systému patří mezi další povinnosti smluvních stran CPB. Všechna tato rozhodnutí byla přijata v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2001/18/ES o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí.

Další záložka je věnována problematice koexistence („Co-existence“), která je v rámci CPB vnímána jako součást problematiky socio-ekonomických hledisek. Dokument uvedený v této záložce pojednává o problematice pravidel koexistence uzákoněných v České republice od roku 2005.

V záložce „Other resources“ jsou představeny 2 projekty UNEP/GEF (Program OSN pro životní prostředí / Globální fond životního prostředí), jež získala Česká republika v obdobích 2002-2004 a 2006-2010. První projekt byl zaměřen na podporu zavedení opatření zajišťujících biologickou bezpečnost, druhý, navazující projekt si klade za cíl podporu jejich implementace. Ke stažení jsou rovněž nejzásadnější publikace vydané s podporou obou projektů, mezi jinými například slovník pojmů z oblasti genetických zdrojů a biologické bezpečnosti.

Posledním záložkou na této internetové stránce jsou „Relevant links“, kde je možné nalézt zajímavé odkazy na české i evropské webové stránky s problematikou geneticky modifikovaných organismů a souvisejícími tématy.

Výše představený český informační systém biologické bezpečnosti bude nadále průběžně aktualizován a zajišťován oddělením geneticky modifikovaných organismů Ministerstva životního prostředí České republiky s cílem, aby se etabloval jako platný zdroj informací v anglickém jazyce o problematice geneticky modifikovaných organismů v České republice.

Hana Jiráková, Miroslav Večeřa
odd. geneticky modifikovaných organismů
Ministerstvo životního prostředí ČR

TECHNOLOGICKÝ PROFIL ČR

Asociace výzkumných organizací (AVO) spolupracuje na řešení zajímavého projektu nazvaného „Technologický profil ČR“ (TP). Tento projekt řeší Asociace inovačního podnikání ČR a je financován MŠMT v rámci programu KONTAKT. AVO je v projektu garantem za datovou část o výzkumných organizacích. Vlastní prověření a aktualizaci příslušné části databáze TP zajišťuje Společnost Inovačního centra elektroniky (INCEL), člen Asociace výzkumných organizací.

Nejprve několik slov k projektu Technologický profil obecně. Práce na projektu probíhají již od roku 1998 a jeho základem je databáze subjektů působících v celém inovačním procesu. Inovační proces je členěn na fáze „Vymyslet“, „Vyrobit“, „Prodat“ a na část nazvanou „Inovační prostředí“. Z toho členění vyplývá i obsah databáze, která je unikátní v tom, že obsahuje subjekty působící v základním výzkumu, aplikovaném výzkumu, vysokém školství, výrobě, službách, poradenství, legislativě a řízení atd. Těchto subjektů je v databázi nyní cca 2650 a jsou rozděleny podle typu organizace na 12 skupin:

- Vysoké školy a jejich fakulty
- Pracoviště Akademie věd ČR
- Resortní výzkumné organizace
- Privátní výzkumné organizace
- Pracoviště transferu technologií
- Vědeckotechnické parky
- Asociace, spolky a sdružení
- Ministerstva
- Poradenské organizace
- Regionální rozvojové agentury
- Regionální poradenská a informační centra
- Inovační firmy

Přínosem databáze je zejména to, že kromě obvyklých kontaktních a běžně dostupných údajů obsahuje i údaje o technologiích, kterými se subjekty zabývají a popis činnosti formou volného textu. Databáze Technologický profil ČR je v jednotlivých letech řešení prezentována na multimediálním CD-ROM Technologický profil ČR v dvoujazyčné variantě (česky a anglicky). Dále je v provozu databáze Technologický profil ČR na Internetu na adrese www.techprofil.cz. Internetová podoba obsahuje

široké možnosti výběru subjektů z databáze, obsahuje i možnost výběru podle mapky krajů. Aktualizace a rozšíření záznamů provádějí garanti za jednotlivé části databáze:

- Asociace inovačního podnikání ČR (AIP ČR)
- Asociace poradenství v podnikání ČR (APP)
- Asociace výzkumných organizací (AVO)
- Česká asociace rozvojových agentur (ČARA)
- Společnost vědeckotechnických parků ČR (SVTP)
- Svaz průmyslu a dopravy (SP ČR)
- Útvar rozvoje Hlavního města Prahy

Předmětem řešení tohoto projektu je ale nejen aktualizace a rozšíření databáze subjektů Technologický profil ČR. Kromě toho se jedná o shromáždění informací o vyhlášených programech mezinárodní spolupráce ve výzkumu a vývoji, informací o databázích inovačních produktů (výrobků, technologií nebo služeb) a informací o odkazech prezentování výzkumu a vývoje na vybraných vysokých školách, o síti vědeckotechnických parků v ČR, o prezentaci poradenských organizací pro inovační podnikání a odkazy na další důležité informační zdroje např. prezentace regionálních inovačních strategií v jednotlivých krajích apod. Při prezentování informací shromážděných jak na CD-ROM, tak na www.techprofil.cz jsou využívány jak pravidelné konference, sympozia a výstavy, které pořádá nebo kterých se účastní Asociace inovačního podnikání ČR jako řešitelská organizace, tak i obdobné akce pořádané spolupracujícími organizacemi.

Projekt Technologický profil České republiky slouží již téměř 10 let k získávání informací o inovačním prostředí České republiky a je velmi vítaným zdrojem informací pro zahraniční zájemce o spolupráci ve vědě, výzkumu a při hledání partnerů v inovačních firmách. To dokládá i návštěvnost webu www.techprofil.cz, která dosahuje průměrně 13 tisíc přístupů měsíčně a to prakticky z celého světa. Technologický profil na CD dosahuje náklad cca 5000 ks ročně a je rozšiřován mnoha způsoby včetně zahraničních zastoupení ČR.

Tomáš Vaněk

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.

GENETICKY MODIFIKOVANÉ PLODINY V ZEMĚDĚLSTVÍ ČR – BT KUKUŘICE

V ČR se od roku 2005 produkčně pěstuje geneticky modifikovaná kukuřice typu MON810, která se vyznačuje odolností k hlavnímu škůdci kukuřice, zavíječi kukuřičnému. Vzhledem k tomu, že princip genetické modifikace u této kukuřice je založen na produkci tzv. Bt proteinu, toxického pro zástupce řádu lepidop-

tera, setkáváme se u této plodiny často s pojmem Bt kukuřice.

V letošním roce opětovně došlo v ČR k nárůstu ploch, které byly osety Bt kukuřicí. Podle evidence Ministerstva zemědělství a v souladu se statistikami Ministerstva životního prostředí bylo celkem zaevido-

váno 8.380 ha ploch s Bt kukuřicí, zasetou 171 pěstiteli. Nejvíce Bt kukuřice bylo tradičně zaevidováno v Jihomoravském kraji (přes 2.000 ha celkem) a dále pak v kraji Středočeském (přes 1.600 ha, včetně Prahy) a Plzeňském (přes 900 ha). Naopak v kraji Libereckém nebyla ohlášena žádná plocha s Bt kukuřicí a v Karlovarském kraji byl evidován pouze jeden polní pokus o velikosti 0,01 ha. Produkce Bt kukuřice v ČR je ve většině případů využívána jako krmivo pro hospodářská zvířata, z menší části také jako surovina pro výrobu bioethanolu či bioplynu. Bt kukuřice vypěstovaná v ČR není užívána pro potravinářské účely.

V evropském kontextu se ČR řadí mezi dalšími 6 státy EU na druhé místo, co se celkové výměry Bt kukuřice týká. Jiná geneticky modifikovaná plodina není v EU povolena ke komerčnímu pěstování. Nejvíce zkušeným členským státem z pohledu pěstování Bt kukuřice je Španělsko, kde je tato kukuřice pěstována již od roku 1998 a její celkové plochy v letošním roce dosáhly téměř 80 tisíc hektarů. Velký nárůst ploch zaznamenalo oproti předchozímu roku Rumunsko, Polsko a Slovensko (viz Tab. 1). K dalším pěstitelům Bt kukuřice

Tab. 1

	2005	2006	2007	2008
celkem EU	55090	62520	110390	107720
Španělsko	53200	54000	75150	79270
Francie	500	5000	22000	0
ČR	270	1290	5000	8380
Portugalsko	780	1250	4260	4850
Německo	340	950	2640	3170
Slovensko	0	30	950	1900
Polsko	0	0	100	3000
Rumunsko	0	0	290	7150

ce se dále řadí Portugalsko a Německo. Na základě politického rozhodnutí bylo v letošním roce zakázáno pěstování Bt kukuřice ve Francii, která v loňském roce zaevidovala 22 tisíc hektarů této plodiny.

O pěstování Bt kukuřice projeví čeští pěstitelé zájem již v roce 2005, tedy v prvním roce, kdy bylo možné využít osivo této kukuřice pro produkční pěstování. 52 pěstitelů tehdy zkušebně oselo celkem 270 ha. Od té doby plochy s Bt kukuřicí i počty pěstitelů každoročně narůstají (viz Tab. 2). V letošním roce se jednalo již o 171 pěstitelů

Tab. 2

rok	výměra v ha	počet pěstitelů
2005	270	52
2006	1290	85
2007	5000	131
2008	8380	171

Bt kukuřice, a to zástupců všech typů podnikání od fyzických osob, přes právnické subjekty (a.s., s.r.o.), po zemědělská družstva i výzkumná a vzdělávací pracoviště. Někteří z těchto pěstitelů mají již čtyřleté zkušenosti s Bt kukuřicí. 2 největší pěstitelé v rámci ČR letos oseli plochy Bt kukuřice větší než 500 ha, na druhé straně u 35 pěstitelů byly evidovány víceméně pokusné plochy do 1 ha.

Nejvíce pěstitelů (1/4) zaseto Bt kukuřicí o celkové výměře mezi 20 – 50 ha.

Důvodem nárůstu ploch s Bt kukuřicí jsou přetrvávající problémy našich pěstitelů se škůdcem zavíječem kukuřičným, proti kterému je modifikace Bt kukuřice zacílena, a pozitivní tříleté zkušenosti českých pěstitelů. Výhodou pěstování Bt kukuřice je, dle samotných pěstitelů, významné snížení či úplná eliminace napadení rostlin plísňemi (sekundární efekt napadení rostliny zavíječem), významně nižší poškození porostu, a tím i vyšší dosahované výnosy než u klasických odrůd, redukce používání pesticidů a kvalitnější krmivo pro hospodářská zvířata.

Pěstování Bt kukuřice je v ČR podmíněno zákonnými opatřeními, tzv. pravidly koexistence, jejichž cílem je oddělení produkce geneticky modifikovaných organismů od produktů klasických či Bio produktů tak, aby spotřebitelům zůstala zachována možnost volby potravin různého původu. Mezi stěžejní opatření pravidel koexistence patří prostorová izolace porostů Bt kukuřice (i obecně jakékoliv další potenciální geneticky modifikované plodiny) od ostatních porostů nemodifikované kukuřice (resp. příslušných plodin). Pro tyto účely je nutné dodržovat stanovené minimální vzdálenosti pěstování Bt kukuřice od kukuřice klasické či pěstované v režimu ekologického zemědělství, případně provést obsev Bt plodiny klasickými hybridy, které slouží jako fyzická bariéra proti přenosu transgenního pylu. Každý pěstitel Bt kukuřice musí také ohlásit místo pěstování sousedním pěstitelům (před i po zasetí), Ministerstvu zemědělství (před i po zasetí) a Ministerstvu životního prostředí (po zasetí). Pro účely zpětné dohledatelnosti produktů geneticky modifikovaných rostlin je vyžadována evidence podstatných údajů o pěstování a sklizni v podniku a její uchování minimálně po dobu 5 let. Ministerstvo zemědělství ve spolupráci s regionálními zemědělskými agenturami a Státní rostlinolékařskou správou každoročně kontroluje dodržování uvedených pravidel.

V ČR se pěstují i další typy geneticky modifikovaných plodin, jako např. kukuřice tolerantní k herbicidům na bázi účinné látky glyfosát, brambory s pozměněným obsahem škrobových frakcí, brambory se zvýšenou odolností k plísni bramborové, transgenní linie lnu a tabáku či slivoň Stanley rezistentní k virovému onemocnění. Všechny tyto uvedené typy geneticky modifikovaných plodin se však pěstují pouze v minimálním rozsahu v rámci tzv. režimu „uvádění do životního prostředí“, a to za přísných podmínek stanovených zákonem č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů, a specifikovaných v prováděcí vyhlášce. Produkty těchto kukuřic jsou určeny výhradně k vědeckým účelům a nejsou komerčně využívány. Pěstování v rámci režimu uvádění do životního prostředí je v ČR pod dohledem České inspekce životního prostředí.

Marie Křístková

Ministerstvo zemědělství, odbor rostlinných komodit

ČESKÉ STANOVISKO K REGULACI ZELENÉ BIOTECHNOLOGIE

České předsednictví má před sebou mnoho těžkých a dalekosáhlých problémů a otázky regulací biotechnologických metod v zemědělství vůbec v programu nemělo. Jenže Francie si tuto problematiku dala jako jednu z priorit, čímž situaci změnila. Je to trochu zábavné, protože Francie stojí před Evropským soudem, protože neimplementovala jako jediný členský stát včas směrnice o regulaci GMO. Bohužel, francouzské návrhy směřovaly ke zpřísnění a k dalšímu posunu této záležitosti od vědy do politiky, zejména zavedením t.zv. socio-ekonomických hledisek do vědeckého posuzování „rizika“ geneticky modifikovaných organismů (GMO). Symbolické bylo, že prezident Sarkozy zakázal ve Francii vysévat Bt kukuřici – jedinou GM plodinu, povolenou k pěstování v EU.

Celý postup Francie v souvislosti s tímto zákazem činil dojem, že jde o jakési gesto, v jehož úspěšnost sami autoři nevěří. To se také potvrdilo, EFSA – (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) francouzské zdůvodnění odmítla. Není na nás, abychom tento politický krok hodnotili, ale závažné je, že oficiálně byl zdůvodňován vědou. Věda, vědecký přístup byly neustále skloňovány ve všech dokumentech, které Francie k otázce regulací předložila. Závěrem za předsednictví Francie vyšel dokument Rady ministrů životního prostředí ze 4. prosince (http://www.consilium.europa.eu/ueDocs/cms_Data/docs/pressData/en/envir/104509.pdf), odvolávající se na výzvu Komise, aby EFSA nejpozději do března 2010 vytvořila nová pravidla pro hodnocení rizika GMO pro životní prostředí. Rada v tomto dokumentu vyzývá členské státy, aby zapojily svou vědeckou komunitu do diskuse o tomto úkolu a pomohly vytvořit síť evropských vědeckých organizací různých oborů – včetně ekologie – účastnících se posuzování dopadů zelené biotechnologie na potraviny a krmiva.

Vzhledem k této situaci bez ohledu na to, jaký bude postup státních orgánů, nemůže česká vědecká komunita nereagovat. Proto Biologické Centrum AV ČR v.v.i. v Českých Budějovicích se ujalo úkolu oslovit vědecké pracovníky angažované v oborech, které s touto problematikou souvisejí. Zkušenosti a názory vědců se po patřičném prodiskutování shrnou do Bílé knihy, která nebude mít přímou vazbu na státní orgány ani na firmy, ale bude kvalifikovaným vyjádřením vědecké komunity.

Pro naše i zahraniční adresáty Bílé knihy bude v úvodu ukázáno, že čeští vědci mají dostatek zkušenosti se k otázkou aplikací zelené biotechnologie vyslovit. Plyne to nejen z jejich vědecké práce, která bude doložena příklady nejvýznamnějších publikací, ale i činností v různých mezinárodních orgánech v dané oblasti.

Zdůrazněna bude i česká legislativa, která na rozdíl od Francie bezprostředně reagovala na legislativu EU dávno před tím, než jsme byli členy. Jistě vzpomínáme,

že hned po roce 1989 se ustavila skupina dobrovolníků, která registrovala a konzultovala všechny práce s rekombinantní DNA. Byli to vědci, kteří iniciovali legislativní kroky české vlády a v podstatě koncipovali zákon, který vyšel v roce 2000.

Dalším podpůrným faktorem jsou naši zemědělci. Jejich podpora moderních biotechnologických metod je jednoznačná a účast v polních testech GM plodin jim přinesla praktické poznatky. To se projevilo rychlým vzestupem ploch, na kterých se pěstuje jediná povolená GM plodina – Bt kukuřice.

Vlastní stanovisko české odborné komunity vyplývá z diskusí, které mají proběhnout do konce března, aby v dubnu mohla být Bílá kniha postoupena evropským vědeckým organizacím. V tomto stanovisku bude nepochybně kladen důraz na nutnost adekvátní kontroly k jakémukoli studiu vlivu GMO na životní prostředí. Politici běžně vystupují tak, jakoby existující agrotechnika žádné negativní ekologické dopady neměla, ty vznikají teprve zavedením GM plodin. Bohužel, takto jsou i koncipovány některé projekty rámcového programu. Na tuto nesrovnalost již upozorňoval Lord May jako předseda Royal Society.

Royal Society také důrazně korigovala populární tradovaný názor, že herbicid tolerantní GMP (HT GMP) mají negativní dopad na biodiverzitu. Tyto plodiny se svými vlivy na biologické společenstvo vůbec neliší od běžných. Agrotechnika používající masivní aplikaci herbicidů je to, co biodiverzitu ovlivňuje. Tento vliv však může být jak negativní, tak pozitivní, jak ukázaly anglické polní pokusy. Populisticky se také šíří názor, že herbicidy se používají jen na HT GMP, kdežto běžné plodiny žádné herbicidy nevyžadují. Tady se opět vrací faktor adekvátní kontroly, která musí stejným metrem poměřovat vlivy běžné agrotechniky i agrotechniky s využitím GMP.

Vědci také jistě zdůrazní, že socio-ekonomické faktory patří do oblasti politiky, ne vědy. Jaký vliv na hospodaření a ekonomickou situaci zemědělců bude mít použití GMP, závisí na ryze ekonomických podmínkách jako jsou ceny zemědělských produktů, osiv, agrochemikálií, pohonných hmot a techniky, v neposlední řadě i na situaci na trhu pracovních sil. Dále sem silně vstupuje politika, zejména daňová a dotační. To je zcela jiná rovina než vědecké posuzování ekologických dopadů. Nehledě na to, že uvedené faktory jsou značně kolísaví, takže jejich zapojení např. do rozhodovacího procesu schvalování GMP k pěstování, který trvá několik let, by bylo nevhodné.

Takové a další body stanoviska českých vědců budou v Bílé knize doloženy jejich vlastními výzkumy i referencemi na spolehlivé výsledky zahraničních skupin. Zřetelně je nutno oddělit výsledky prezentované neproověřeným způsobem, jako přes media nebo ministerstva (nedávný případ z Rakouska).

Významnou kapitolou jistě bude informace veřejnosti. Jak ukázal Eurobarometer průzkumem mínění

Evropanů v roce 2005, je stav velmi špatný, přímo ostudný. Nátlakovým demagogům se podařilo do mysli občanů vpravit analogii mezi transgenem a prionem, takže více než polovina Evropanů je přesvědčena, že snědí-li geneticky modifikovaný plod, změní se jejich dědičnost. Za pozornost stojí, že rozšířením EU se situace zhoršila.

Je iluzí se domnívat, že proti dobře finanční zajištěným demagogům (jeden z komisařů EU jim věnoval přes sedm milionů eur!) zaměstnávajícím profesionály na PR a advertising, je účinnou silou popularizační angažovanost vědců. Ti jednak mají jiné úkoly, jednak na psychologicky účinné ovlivňování veřejnosti nejsou specialisté. Kromě toho za tuto činnost nejsou ani placeni ani podle ní hodnoceni. Tím se dostávají do naprosto nerovné pozice vůči nátlakovým skupinám, které mají agitaci proti biotechnologiím jako hlavní náplň, globální organizaci, speciální odborníky a finanční fondy na mediálně atraktivní akce.

Je zřejmé, že problémů, které v oblasti regulace a obecného pojmání biotechnologií je hodně. Mají velký dopad na konkurenceschopnost evropského zemědělství. To však je sféra ekonomů a politiků. Pro evropské vědce však nemůže být lhostejné, že vinou kriminálních akcí „aktivistů“ ničících pokusná pole (a hojně popularizovaných některými médii), musely i některé evropské univerzity zrušit výzkumné projekty. Neměli bychom se smířovat ani s tím, že v dusné atmosféře evropských regulací se firmy rozhodují přenést výzkum mimo Evropu, což znamená, že s ním odcházejí evropští, zejména mladí, odborníci. O tom, že by Evropa naopak přitahovala nejlepší mozky v oboru, si můžeme nechat jen zdát.

Z těchto důvodů by naši odborníci neměli litovat něco ze svého času a energie věnovat spolupráci s BC AV ČR, aby hlas českých vědců byl v době našeho předsednictví slyšet.

Jaroslav Drobník
Sdružení BIOTRIN, Praha

PROBLEMATIKA GMO NA 13. MEZINÁRODNÍM BIOTECHNOLOGICKÉM SYMPOSIU

IBS 2008 (13th International Biotechnology Symposium and Exhibition, www.ibs2008.org) se konalo pod heslem „Biotechnology for Sustainability of Human Society“ poprvé v Asii, v Dalianu, Čína, 12. – 17. 10. 2008. Symposium je pořádáno v pravidelných čtyřletých intervalech pod záštitou světové chemické organizace IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, www.iupac.org), a to vždy v jiném světadíle. Členem IUPAC je i Česká republika zastoupená Českým komitétem pro chemii.

Vzhledem k rychle rostoucím poznatkům i aplikacím v biotechnologiích bylo IUPACem rozhodnuto, že čtyřletý interval konání symposií se zkrátí na 2 roky, takže příští IBS se bude konat již v roce 2010 v italském Rimini, a to ve dnech 15.-19.zář. K dispozici je již webová stránka symposia www.ibs2010.org, která se dá snadno zapamatovat.

Právě skončené 13. IBS se konalo v moderním kongresovém centru postaveném francouzskými architekty. Centrum je jednou z dominant největšího asijského náměstí Xinghai Square. V jeho středu stojí památník připomínající navrácení Hongongu Číně. Samotný Dalian je moderní rychle se rozvíjející pětimilionové město. Symposium mělo širokou podporu místních úřadů a do jeho organizace byly zapojeny stovky studentů místních univerzit, kteří také zaplnili neobsazené židle v hlavním sále, jak při oficiálních ceremoniích, tak i plenárních přednáškách. Program byl velmi obsáhlý a přednášky probíhaly paralelně někdy až ve 14 místnostech, takže se nezřídka stávalo, že nebylo možno stihnout vše co chtěl člověk slyšet.

Čiňanům nebylo možno upřít přesnost a snahu o ideální organizaci, avšak v řadě případů se jim to nedařilo. Oprávněně by bylo možno kritizovat časté a někdy pozdě ohlášené změny v programu, neoznačené panely posterů či bourání exhibičních stánků ve čtvrtek odpoledne v době konání přednášek. Přes některé tyto nedostatky bylo symposium velice přínosné, jak po stránce odborné, tak společenské. Bylo totiž i příležitostí k osobnímu setkání s kolegy z celého světa a konání řady vedlejších akcí jako např. zasedání redakčních rad odborných časopisů, navázání kontaktů s představiteli čínských universit, výzkumných ústavů i firem, atd.

Program symposia byl rozdělen do 9 hlavních sekcí, 54 (!) pracovních zasedání a 3 speciálních zasedání týkajících se mezinárodní spolupráce, výuky biotechnologií a biotechnologickému průmyslu v Asii a především v Číně (viz příloha). Problematika GMO zasahovala do řady sekcí a pracovních zasedání. Zde se budeme věnovat jen některým základním pohledům. Pro podrobnější seznámení s obsahem jednotlivých přednášek můžeme jen odkázat na jejich abstrakta, která jsou k dispozici, jak v tištěné, tak elektronické formě na CD. Témata přednášek lze v zásadě rozdělit do následujících okruhů:

1. Přijímání GMO, současný stav a výhledy do budoucna

Zajímavou přednášku (KN-045) přednesl Clive James (Cornell University, Ithaca, NY, USA), který je Vám všem jistě znám jako zakladatel organizace ISAAA (již před

20 léty, www.isaaa.org) a z jehož webových stránek každoročně čerpáme aktuální údaje o plochách GM plodin ve světě. Tato organizace je a do budoucna zůstane výhradně orientována na zemědělské plodiny (ne na živočišné produkty), snaží se o výměnu a sdílení zkušeností s GMO, pevně věří v možnost eliminace chudoby pomocí GM plodin a podporuje koexistenci různých agrikulturních systémů. Pádným argumentem pro rozšiřování pěstování GMO je, že již současné plochy GM plodin převyšují 4x území Velké Británie a 55 % světové populace žije v zemích, kde se GMO pěstují. Očekává se nárůst pěstování GM plodin především v Asii a dále v Africe. Čína investuje miliony dolarů do GM technologií. Přes 20 GM plodin zde bylo schváleno pro uvolnění do prostředí. Největší pozornost je zatím věnována Bt-bavlníku (pěstován od r. 1997), kde bylo údajně dosaženo 9 % zvýšení produkce a 60 % redukce používaných pesticidů (IL-038). Intenzivní pozornost je věnována GM-rýži, kukuřici, ale také zelenině.

2. Problematika bezpečnosti GMO

V Asii je aktuálním problémem zamezení možného přenosu genů pyly z modifikované rýže na nemodifikovanou rýži a zejména na její divoké příbuzné („wild“ and „weedy“ rice). Teoretických řešení je celá řada, např. změna doby kvetení. Byly také presentovány nové přístupy ke stanovení rizik na modelových systémech, např. IV4-0-010. Strategii „risk assessment for GMO in global perspective“ se také zabýval Holanďan H. Kuiper v příspěvku (KN-048) zařazeném do sekce potravinářské biotechnologie. Zde lze nalézt také informace o monitoringu GMO v Koreji (IL-024) a Japonsku (IL-055).

3. Plodiny, které jsou středem výzkumného zájmu

Středem zájmu jsou především již plodiny geneticky modifikované a široce pěstované (kukuřice, bavlník, sója, řepka) a je snahou tyto plodiny nadále zlepšovat. Blízké rozšíření jistě čeká rýže, sorghum a mnohé ovoce, zeleniny a další olejnaté rostliny.

4. Co se očekává od GM-technologií

- a) *zvýšit výnosy* (ochrana proti škůdcům, patogenům, zlepšením využitelnosti živin, zejména dusíku, ochrana před biotickými a abiotickými stresy),
- b) *rozšířit pěstební plochy na dosud nevyužitelné oblasti* (zasolené, suché, mokré půdy, příliš slunce, nízké teploty, větry, atd),
- c) *změnit složení komodity z hlediska výživy (zdraví) lidí a zvířat či technologických požadavků* (např. snížení obsahu ligninu u surovin pro výrobu biopaliva),
- d) *ovlivnění doby sklizně a skladovatelnosti ovoce a zeleniny – omezení ztrát při transportu a skladování* (např. rajče je vhodným modelem ke studiu ovlivnění zrání klimakterického ovoce – dozrávání závislé na tvorbě ethylenu).

5. „Green factories“ („Rostlinné a živočišné bioreaktory“)

Možnosti produkce farmaceuticky zajímavých látek pomocí rostlin, ale i živočichů jsou stále velmi aktuální. Řáda příspěvků se zabývala touto problematikou, např. lidský osteogenický protein („hop 1“), který může regenerovat chrupavky a kosti a být použit v terapii řady onemocnění byl navržen k produkci v GM tabákových semenech (IV2-0-001), vakcína proti prasečímu reprodukčnímu a respiračnímu syndromu byla exprimována v nízkoalkaloidním tabáku (IV2-0-002), kuřecí alfa-interferon, který chrání kuřata proti virovým infekcím byl získán v salátových listech (IV2-P-004), rekombinantní lidský interleukin-2 byl exprimován v rajčatech (IV2-P-008), atd.

6. GM mikroorganismy

Transgenním mikroorganismům byla věnována relativně malá pozornost vzhledem k jejich širokému použití v biotechnologiích. Největší pozornost byla zaměřena na rekombinantní mikroorganismy v zemědělství, např. ke zlepšení využitelnosti živin (IV6-0-003, IV6-0-016), v ochraně proti fytopatogenním houbám (IV6-0-017, IV6-Y-015), ovlivnění půdní ekologie (IV6-P-002). Druhou oblastí aplikace transgenních mikroorganismů jsou bioremediace, kde genové transformace jsou zaměřeny na rychlejší odbourávání organických polutantů. Celkem pochopitelně se neuvádějí práce o použití transgenních mikroorganismů v biotechnologickém průmyslu, zejména ve farmaceutickém, neboť se jedná o patentovatelné výsledky.

7. Geneticky modifikované potraviny

Této problematice byla věnována zvláštní sekce, která s potravinářskými mikroorganismy a bezpečností potravin tvořila sekci „potravinářských biotechnologií“. Bohužel, zde byly presentovány jen práce týkající se specifických asijských fermentovaných potravin, a proto se nebudeme zabývat hodnocením postupů při přípravě potravin se kterými nemáme osobní zkušenosti.

8. Vývoj technik umožňujících zlepšení a zefektivnění genetických modifikací

Jedná se o řadu původních prací, které lze těžko převést na společného jmenovatele.

9. Vývoj nových technik umožňujících rychlé a laciné stanovení, resp. detekci většího množství genetických modifikací

Přehled současně používaných a perspektivních metod podal ve své přednášce (KN-035) A. Holst-Jensen (Norsko). Pro orientační, rychlý (několik minut) a laciný průkaz přítomnosti transgenního proteinu jsou vhodné „dipstickové ELISA testy“. Všechny ostatní metody jsou časově a ekonomicky náročné. Slovinci presentovali v několika ústních i posterových sděleních (IV4-0-008, IV4-0-009) výsledky projektu financovaného EU v rámci „6th Framework Programme“. Jedná se o multiplex kvantitativní stanovení GMO. Metody jsou

uváděny pod zkratkami NASBA, NAIMA, NAIMA-MA (viz uváděné abstrakty). Vzhledem k tomu, že více jak 100 GMO bylo světově schváleno pro komercializaci je nutná database o níž referovali Korejci.. Má název GMDD: GMO detection method database a shrnuje téměř všechny dosud vyvinuté přístupy. Registrovaní uživatelé mohou také přispívat informacemi, které budou zveřejněny po otestování. Database umožňuje

snadnější analýzu GMO. Je k dispozici na <http://www.gmdd.shgmo.org>. Microarray pro detekci 18 GMO presentovali 3 Kimové z Koreje (IV-P-011). Ostatní příspěvky popisují různé variace PCR.

Jan Káš a Kateřina Demnerová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

ZALOŽENÍ ZÁJMOVÉHO SDRUŽENÍ PRÁVNICKÝCH OSOB CZECHBIO



Dne 18. prosince 2008 bylo založeno sdružení **CzechBio – Národní asociace biotechnologických společností ČR z.s.p.o.**, první asociace biotechnologických společností ČR, která v současné chvíli spojuje dvě desítky soukromých biotechnologických společností.

Biotechnologie je obor, který jak v průmyslové oblasti tak v oblasti VaV nabývá stále většího významu. Je to obor jehož možnosti pozitivně ovlivnit ekonomický rozvoj země jsou teprve postupně odkrývány. Je velmi důležité, že rozvoj oboru biotechnologií je Evropskou unií vnímán jako jedna z priorit (s cílem snížit náskok USA a Kanady). V souladu se záměrem EU, také ČR zařadila molekulární genetiku a biotechnologie mezi vybraná prioritní témata dlouhodobých základních směrů výzkumu. Podpora rozvoje biotechnologií je jednoznačným signálem orientace ekonomiky na systém s vyšší přidanou hodnotou, na vytváření a podporu ekonomiky založené na znalostech a inovacích. Lze předpokládat, že právě biotechnologie bude oborem, který se stane jedním z pilířů dlouhodobého a udržitelného rozvoje.

Iniciátorem vzniku sdružení je **Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.**, jehož hlavní motivací pro založení „biotechnologické platformy“ bylo jednak vědomí roztržičnosti biotechnologického sektoru průmyslu v ČR a jednak snaha usnadnit komunikaci mezi potenciálními zájemci o spolupráci. Jednání o založení asociace začalo probíhat v létě 2008 a postupně bylo při přípravě vzniku asociace osloveno 55 subjektů nejen z komerční oblasti, ale bylo mezi nimi i několik ústavů AV ČR a vysokých škol. Ve velmi krátké době se podařilo dospět k dohodě na základních parametrech sdružení, jako jsou např. základní popis činnosti, právní forma subjektu atd. Ustavující schůze se uskutečnila 18. prosince 2008, na ní podpisem dvaceti zakládajících členů vznikla **první biotechnologická asociace v ČR**.

V současnosti, je členem sdružení 20 komerčních subjektů. Jedním z prvních a ze zásadních úkolů sdružení je rozšířit členskou základnu o další členy nejen z komerční sféry, ale i z akademických institucí. Předpokladem splnění tohoto cíle je samozřejmě to, že sdružení bude nabízet takové aktivity a takové mož-

nosti spolupráce, které budou pro potenciální zájemce o členství zajímavé a přínosné. S velkou pravděpodobností bude prvním členem z nekomerční sféry samotný iniciátor založení sdružení, Biotechnologický ústav.

Cílem sdružení je zrychlení a usnadnění vývoje a posílení komerční aktivity biotechnologických organizací napříč Českou republikou a zintenzivnění komunikace mezi všemi klíčovými hráči v biotechnologiích v České republice. Tím je myšlena nejen komunikací mezi komerčními partnery, ale i podpora spolupráce mezi komerční oblastí a akademickou sférou.

Neméně důležitou aktivitou sdružení je řešení společných projektů a možné čerpání z dotačních programů na podporu konkurenceschopnosti jednotlivých členů a jejich společných projektů. V současné chvíli nejambicióznějším cílem je, aby se s pomocí sdružení podařilo vybudovat Národní centrum pro biotechnologickou výrobu.

První slavnostní představení sdružení CzechBio proběhlo 21. ledna na Krajském úřadě Středočeského kraje (<http://www.kr-stredocesky.cz/portal/aktuality/velke-inovacni-projekty-maji-jednoznacnou-podporu-stredoceskeho-kraje.htm?pg=1>)

Základní informace o sdružení:

název: CzechBio – Národní asociace

biotechnologických společností ČR, z.s.p.o.

právní forma: zájmové sdružení právnických osob

sídlo: Nad Safinou II 366, 252 42 Vestec u Prahy

počet členů: 20

statutární orgán: představenstvo (předseda

představenstva – Dr. Marek Moša

(společnost Sevapharma)

manažeři klastru: Ilona Dita, Jan Rajnoch

kontaktní údaje: dita@img.cas.cz, rajnoch@img.cas.cz

Členové: Apronex, Ascoprot Biotech, BIOPHARM, BioTest, BioVendor, Bioveta, BVT Technologies, Enantis, ENVISAN-GEM, EPS, GENERI BIOTECH, LABINA, LentiKatęs, LONZA BIOTEC, Protean, Proteix, SEVAPHARMA, Top-Bio, VIDIA, CS-PROJECT.

Jan Rajnoch

Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i.

TRANSMEMBRÁNOVÉ PROTEINY – VÝZVA PRO HLEDÁNÍ NOVÝCH ANALYTICKÝCH PŘÍSTUPŮ

Radovan Hynek

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

Transmembránové proteiny leží na hranicích různých prostředí, a to jak mezi intracelulárními kompartmenty, tak mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem. Není proto překvapující, že hrají zásadní role v řadě biologických procesů, jakými jsou například buněčný či mezikompartmentový transport nebo přenos signálu [1-3]. Odhaduje se, že až třetina kódujících genů v eukaryotních organismech odpovídá membránovým proteinům, které mají jednu nebo více transmembránových domén [4,5]. Membránové proteiny tvoří rovněž největší skupinu cílů pro farmaceutika [6-8]. Defekty membránových proteinů mohou navíc souviset s některými onemocněními; například cystická fibróza souvisí s defektem membránového proteinu tvořícího kanál, který reguluje tok chloridových iontů [9, 10].

Přestože je analýza transmembránových proteinů nezbytná pro hlubší porozumění mechanismům řady biologických procesů, jsou tyto proteiny mnohem méně prostudované než rozpustné buněčné proteiny. Jednou z příčin je extrémní hydrofobita jejich transmembránových domén, která komplikuje nebo dokonce znemožňuje využít pro jejich analýzy metody pro jiné proteiny rutinně využívané. To se týká zejména proteinů s transmembránovými doménami typu α -helixů. Kromě α -helixů mohou mít transmembránové domény charakter β -barelů; proteiny s těmito doménami však obvykle tak výrazné problémy při analýzách nepůsobí. Proto je třeba soustředit se při řešení analytických problémů zejména na extrémně hydrofóbní proteiny s více transmembránovými doménami typu α -helixů. Úseky tvořící transmembránové segmenty obsahují převážně hydrofóbní aminokyselinové zbytky a musí být dostatečně dlouhé (uvádí se alespoň 15 aminokyselinových zbytků), aby překlenuly fosfolipidovou dvojvrstvu jako α -helix [11, 12], zatímco výskyt nabitých a polárních aminokyselinových zbytků je omezen na mimomembránové domény [13]. Takovito výrazně amfifilní charakter transmembránových proteinů výrazně komplikuje jejich analýzu. Obzvláště nepříjemné je, že proteiny s více transmembránovými doménami jsou náchylné k precipitaci při izoelektrické fokusaci, což prakticky znemožňuje použití klasické dvojdimenzionální elektroforézy pro jejich separaci. Navíc je z řady důvodů obtížné identifikovat peptidové fragmenty z jejich transmembránových domén. Připočteme-li k tomuto výčtu fakt, že tyto proteiny bývají na řadě míst glykosylované, je zřejmé, že prostor pro jejich identifikaci se dále zužuje. Analýza transmembránových proteinů vyskytujících se v extrémně

malých kvantech (například receptorové proteiny) pak představuje opravdovou analytickou výzvu.

Robustní analytická metoda, jakou je LC-MS/MS (LC odpovídá zkratce pro Liquid Chromatography a MS/MS vyjadřuje možnost získání sekundárního nebo-li fragmentačního hmotnostního spektra) je tak vítaným nástrojem pro analýzu transmembránových proteinů. Je užitečné zmínit, že se nejedná o označení typu hmotnostního spektrometru (je více typů hmotnostních spektrometrů, které mohou být při této technice využity), ale o označení metody, při které jsou molekuly (například peptidové fragmenty) separovány pomocí kapalinové chromatografie a jejich hmotnostní spektra jsou tak získávána postupně, jak jsou eluovány z chromatografické kolony. Tato metoda umožňuje získat nejen hmotnosti velkého počtu peptidových fragmentů (primární hmotnostní spektra – MS), ale i relevantní informace o jejich aminokyselinové sekvenci (MS/MS), což je velmi výhodné, neboť sekvence poskytuje mnohem více informací než pouhá hmotnost peptidu. Za spolehlivou identifikaci proteinu bývá renomovanými proteomickými časopisy považována shoda sekvence alespoň dvou peptidových fragmentů se sekvencí odvozenou na základě známé genetické informace.

V kombinaci s dalšími analytickými přístupy byla metoda LC-MS/MS nedávno úspěšně využita pro vůbec první proteomickou analýzu transmembránových proteinů souvisejících s klíčením semen [14]. Studie zaměřená na transmembránové proteiny plasmatické membrány v aleuronové vrstvě semen ječmene byla prováděna v Dánsku (Technical University of Denmark, Lyngby a University of Southern Denmark, Odense). Buňky aleuronové vrstvy hrají významnou roli v procesu klíčení semen, protože syntetizují a vylučují enzymy hydrolyzující energetické rezervy endospermu [15]. Při klíčení je giberelová kyselina produkovaná embryem navázána na plasmatickou membránu buněk aleuronové vrstvy [16, 17], čímž je nastartována signalizační kaskáda vedoucí k syntéze hydrolytických enzymů a kulminující řízenou smrtí buněk aleuronové vrstvy [18]. Aleuronová vrstva semen ječmene představuje ideální modelový systém pro studium přenosu signálu v rostlinách, protože se dá relativně snadno separovat od jiných pletiv (má tři vrstvy buněk na rozdíl od aleuronových vrstev řady jiných semen, které mají pouze jednu) a vykazuje dobře definované odpovědi na rostlinné hormony giberelovou a abscisovou kyselinu. Dřívější proteomické studie zrání a klíčení semen ječmene byly zaměřeny pouze na rozpustné (nemembránové) proteiny [19-23].

Oddělení plasmatické membrány od ostatních membrán (membrán vnitrobuněčných) kompartmentů je možné dosáhnout pomocí separace v dvoufázovém systému obsahujícím dextran a polyethylenglykol [24]. Plasmatická membrána se extrahuje do horní fáze, zatímco ostatní (vnitrobuněčné) membrány se koncentrují v dolní frakci. Po nalezení vhodných podmínek a při několikanásobném opakování extrakce lze získat frakci obsahující plasmatickou membránu pouze minimálně kontaminovanou vnitrobuněčnými membránami. Závažným problémem ovšem zůstává kontaminace membránové frakce rozpustnými (nemembránovými) proteiny uzavřenými zejména v membránových váčcích nebo asociovaných s membránou prostřednictvím elektrostatických interakcí. Významná redukce kontaminace rozpustnými proteiny je předpokladem pro úspěšnou analýzu transmembránových proteinů; byly popsány různé postupy, většinou využívající kombinaci vyšší iontové síly a mírných detergentů (např. Triton X-100 nebo Brij 58 [25, 26]) pro oslabení elektrostatických interakcí a otevření membránových váčků. Nicméně i po aplikaci těchto postupů bylo možné stále identifikovat značné množství rozpustných proteinů ve frakci plasmatické membrány [27, 28]. Po otestování celé řady podobných metod se ukázalo, že nejsou dostatečně efektivní. Proto byla vyvinuta technika využívající k redukci kontaminace hydrofilními proteiny chromatografii na reverzní fázi prováděnou velmi jednoduchým způsobem [14]. Tato metoda navíc poskytuje možnost určité frakcionace membránových proteinů podle jejich rostoucí hydrofobicity. To umožnilo soustředit se na analýzu frakce obsahující velké množství silně hydrofobních proteinů. Tato frakce byla rozdělena pomocí klasické jednodimenzionální SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) Vybrané pásy byly vykrojeny a přímo

v gelu bylo provedeno specifické enzymové štěpení. Vzniklé peptidové fragmenty ze vzorků odpovídajících jednotlivým pásům na SDS-PAGE byly analyzovány pomocí LC-MS/MS. Proteiny obsažené v jednotlivých pásech byly identifikovány porovnáním dat získaných pomocí LC-MS/MS s dostupnou sekvenční databází.

Po identifikaci proteinů byla provedena predikce jejich transmembránových domén typu α -helixů a výpočet průměrné hydrofobicity. Mezi identifikovanými proteiny byl nalezen vysoký poměr proteinů s předpověděnými transmembránovými doménami (typu α -helixů) vzhledem k proteinům bez předpověděných transmembránových domén ve srovnání se studii proteinů plasmatické membrány prováděnými na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* [27, 28]. Podařilo se identifikovat i proteiny s více než deseti předpověděnými transmembránovými doménami typu α -helixů [14]. Mimo jiné byly nalezeny též dvě nové isoformy plasma membránové H^+ ATPasy a dva transmembránové proteiny s dosud neznámou funkcí. Cenná byla rovněž identifikace dvou pyrofosfatas – extrémně hydrofobních proteinů s 14 předpověděnými transmembránovými doménami typu α -helixů. Byly identifikovány rovněž iontové kanály, což jsou proteiny s transmembránovými doménami typu β -barelů.

Technika kombinující chromatografii na reverzní fázi, jednodimenzionální SDS-PAGE a LC-MS/MS tak umožnila provést průlomovou studii proteinů plasmatické membrány v aleuronové vrstvě semen ječmene [14], což představuje významný předpoklad pro objasnění mechanismů hrajících roli při klíčení semen. Zmíněný nový metodologický přístup má obecnější význam, protože se problematika analýzy transmembránových proteinů z různých organismů potýká s podobnými problémy.

Literatura

- Ott C. M., Lingappa V. R.: *J. Cell Sci.* 115, 2003-2009 (2002).
- Torres J., Stevens T.J.; Samso M.: *Trends Biochem. Sci.*, 28, 137-144 (2003).
- Zhou C., Zheng Y., Zhou Y.: *Genomics, Proteomics Bioinf.* 2, 1-5 (2004).
- Wallin E., Von Heijne G.: *Protein Sci.* 7, 1029-1038 (1998).
- Stevens T.J., Arkin I.T.: *Proteins* 39, 417-420 (2000).
- Hopkins A.L., Groom C.R.: *Nat. Rev. Drug Disc.* 1, 727-730 (2002).
- Russ A. P., Lampel S.: *Drug Discov. Today* 10, 1607-1610 (2005).
- Lundstrom K.: *J. Cell. Mol. Med.* 11, 224-238 (2007).
- Gadsby D.C., Nairn A.C., *Physiol. Revs.* 79, S77-S107 (1999).
- Sheppard D.N., Michael J.W.: *Physiol. Rev.* 79, Suppl.: S23-S45 (1999).
- Elofsson A., von Heijne G.: *Annu. Rev. Biochem.* 76, 125-40 (2007).
- Speers A.E., Wu C.C.: *Chem. Rev.* 107, 3687-3714 (2007).
- Ulmschneider M. B., Sansom M.S., Di Nola A.: *Proteins* 59, 252-265 (2005).
- Hynek R., Svensson B., et al.: *J. Proteome Res.* 5, 3105-3113 (2006).
- Ritchie S., Gilroy S.: *Plant Physiol.*, 116, 765-776 (1998).
- Gilroy S., Jones R. L.: *Plant Physiol.*, 104, 1185-1192 (1994).
- Lovegrove A., Hooley R.: *Trends Plant Sci.* 5, 102-110 (2000).
- Bethke P.C., Lonsdale J.E., et al.: *Plant Cell* 11, 1033-1045 (1999).
- Finnie C., Melchior S., et al.: *Plant Physiol.* 129, 1308-1319 (2002).
- Østergaard O., Finnie C., et al.: Svensson B.: *Proteomics*, 4, 2437-2447 (2004).

21. Bak-Jensen K.S., Laugesen S., et al.: *Proteomics* 4, 728-742 (2004).
22. Finnie C., Bak-Jensen K. S., et al.: *Plant Sci.* 170, 808-821 (2006).
23. Finnie C., Svensson B.: *J. Cereal Sci.* 38, 217-227 (2003).
24. Larsson C., Widell S., Kjellbom P.: *Methods Enzymol.* 148, 558-568 (1987).
25. Van Gestelen P., Asard H., Caubergs R. J.: *Plant Physiol.* 115, 543-550 (1997).
26. Johansson F., Olbe M., et al.: *Plant J.* 7, 165-173 (1995).
27. Alexandersson E., Saalbach G., et al.: *Plant Cell Physiol.* 45, 1543-1556 (2004).
28. Marmagne A., Rouet M.A., et al.: *Mol. Cell. Proteomics* 3, 675-691 (2004).

Souhrn

Membránové proteiny jsou lokalizovány na rozhraních různých prostředí, a proto je jejich izolace a identifikace nezbytným předpokladem pro pochopení řady fyziologických procesů. Extrémní hydrofobicitu proteinů s transmembránovými doménami činí jejich analýzu klasickými proteomickými technikami velmi komplikovanou nebo téměř nemožnou. Proto je třeba hledat pro jejich analýzu alternativní přístupy. Technika využívající chromatografii na reverzní fázi pro redukci kontaminace rozpustnými proteiny a technika kombinující jednorozměrnou elektroforézu s kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií se jeví jako slibné přístupy.

klíčová slova: transmembránové proteiny, proteomika

Abstract

Membrane proteins are located on the interface between different environments. That is reason why their isolation and identification is essential for understanding of number of physiological processes. The extremely hydrophobic nature of proteins with transmembrane domains makes their analysis by classical techniques used in proteomics very complicated or nearly impossible. Thus it is necessary to seek for the alternative approaches for their analysis. Technique using chromatography on reversed phase for reduction of soluble contamination and technique using combination 1D-gel electrophoresis and liquid chromatography on reversed phase coupled to mass spectrometry seems to be very promising.

key words: transmembrane proteins, proteomic

MODERNÍ METODY IDENTIFIKACE BAKTERIÍ

Lucie Piterková

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Úvod

Až do druhé poloviny 20. století byla identifikace a druhové taxonomické zařazení zejména prokaryot založena na jednoduchých biochemických, mikrobiologických a imunochemických testech, které umožňovaly hodnotit pouze fenotypové projevy bakteriální kultury (morfologie buněk, kultivační vlastnosti, biochemická aktivita, antigenní struktura atd.). Taxonomie založená na těchto znacích často neodpovídala skutečnému fylogenetickému vývoji. Sestavit tak správný „systematický koncept“ druhů v bakteriální taxonomii bylo prakticky nemožné. Průlom nastal až v roce 1965, kdy Zuckerkandl a Pauling¹ přišli s teorií, že základním prvkem účastnícím se přímého evolučního vývoje jsou málokdy se měnící, evolučně konzervované sekvence DNA, od kterých by mohly být odvozeny fylogenetické vztahy mezi všemi existujícími živými formami². Nejvhodnějšími adepty na post univerzálního markeru se díky svým univerzálním a stabilním vlastnostem zdály být sekvence genů pro trasférovou (tRNA) a ribozomální (rRNA) RNA, které jsou úzce spjaté s translací. Klíčovou se pak stala práce Carl R. Woese³ a jeho spolupracovníků, kteří v 80. letech minulého století začali studovat fylogenezi prokaryot a katalogizovat rozdíly v genetické struktuře jednotlivých bakteriálních populací pomocí sekvence genů kódujících 16S rRNA.

Započala tak éra molekulárně-genetických diagnostických metod pracujících na základě průkazu specifických úseků DNA, která vnesla do bakteriální systematiky celou řadu významných změn. Tyto diagnostické metody využívají jedinečných vlastností genů kódujících 16S rRNA. Evolučně konzervované úseky těchto genů slouží pro univerzální amplifikaci všech přítomných druhů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR, polymerase chain reaction), zatímco vysoce variabilní oblasti umožňují následující rozlišení přítomnosti genetického materiálu jednotlivých bakteriálních druhů. I přesto, že gen pro 16S rRNA je sám o sobě příliš konzervovaný⁴ a může se u některých bakteriálních druhů vyskytovat i v různých kopiích, které se mohou navzájem alelově lišit, lze i příbuzné kmeny s téměř totožnými fenotypovými projevy a sekvencemi 16S rDNA v současnosti spolehlivě rozlišit díky technikám založeným na rozšířené manipulaci s chromozomální DNA. Jedná se např. o metodu náhodné amplifikace polymorfní DNA (RAPD), dále polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) – restrikční analýza DNA, nebo o kombinaci obou výše zmíněných principů restrikční analýza amplifikované ribozomální DNA (ARDRA) a polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) nebo separace DNA v periodicky se měnícím elektrickém poli pulzní elektroforéza (PFGE).

Izolace DNA

Izolace dostatečného množství chromozomální DNA z biologického materiálu je primárním předpokladem a výchozím bodem každé molekulárně-biologické metody. V současné době je k dispozici pestrá škála metodik v různých modifikacích⁶, jejichž základním krokem izolace je lýze buněk. U bakteriálních buněk je pro lýzi obvykle dostačující rozpuštění biomembrán a denaturace membránových proteinů detergentem. Pro zvýšení čistoty izolované DNA se k lyzačnímu roztoku přidává enzym proteináza K, která štěpí bílkoviny, včetně histonů vázaných na strukturu DNA. Štěpení uvolněné DNA nukleázami zabránil jejich inhibitory jako je např. etylendiaminetetraoctová kyselina (EDTA), která chelatuje ionty vápníku (kofaktor nukleáz). Následná fenol/chloroformová extrakce ponechává obecně nukleové kyseliny rozpuštěné ve vodném prostředí (pufru) a odstraňuje ostatní složky lyzátu. Z přečištěného vodného roztoku je možné nukleové kyseliny vysrážet přidáním koncentrovaného alkoholu (ethanol, isopropanol). Alternativou fenol/chloroformové extrakce, která je velmi pracná a vhodná zejména pro práci s větším množstvím vstupního materiálu, jsou komerčně dostupné izolační kity.

RAPD (random amplified polymorphic DNA)

Metoda RAPD, která je v literatuře někdy označována také jako AP-PCR (arbitrary primed PCR, náhodná PCR), je metoda, která využívá pro PCR jen jeden krátký primer dlouhý nejčastěji 812 bází, jehož sekvence je navržena náhodně, popř. na základě speciálních matematických algoritmů. Krátká sekvence umožňuje primeru nasedat na velké množství přesných či méně přesných komplementárních sekvencí DNA, což je podmíněno i zvolením mírnějších teplotních podmínek hybridizace primeru (annealing, 3040 °C). Výsledkem jsou naamplifikované fragmenty různé délky, jejichž počet je pro každý bakteriální druh specifický. Metoda je technicky jednoduchá a rychlá. Hlavní nevýhodou je nízká specifita reakce a komplikované vyhodnocení.

Počet a velikost amplifikovaných fragmentů totiž závisí nejen na koncentraci DNA templátu, ale i na koncentraci hořčnatých iontů a primeru. Složitější a v mnohých případech subjektivnímu vyhodnocení elektroforetického RAPD profilu lze však předejít zvolením techniky McRAPD (melting curve of RAPD)⁷. Jedná se o nový přístup, jehož princip spočívá zjednodušeně v denaturaci produktů RAPD. Technickým výstupem denaturace je tzv. křivka tání, která je rovněž pro každý druh, popř. kmen specifická.

RFLP (restriction fragment length polymorphism)

Principem metody RFLP je štěpení genomové DNA pomocí restrikčních enzymů. Restrikční enzym je DNA-endonukleáza, která je schopna rozpoznat krátkou specifickou sekvenci DNA (48 nukleotidů), tzv. restrikční místo, a rozštěpit DNA-molekulu buď přímo v restrikčním místě nebo v jeho definovaném okolí. Za daných podmínek vzniká reprodukovatelný počet restrikčních fragmentů určité délky. Počet a délka fragmentů je pro daný bakteriální druh specifická. Tento přístup byl použit např. k druhové identifikaci nových kmenů bakterií rodu *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Borrelia* nebo *Listeria*. RFLP analýza se v bakteriální systematice používá mimo jiné i pro detekci molekulárních přesmyků a mutací v genomu. Z RFLP vychází metoda ribotypizace, která je založena na detekci DNA polymorfismu v genech pro rRNA a v jiných blízkých regionech bakteriálního chromozomu prostřednictvím selektivní hybridizaci restrikčních fragmentů se sondami připravenými z genů pro 16S rRNA nebo 23S rRNA.

V posledních letech se metoda RFLP začala čím dál častěji používat v kombinaci s PCR. Pro účely molekulární typizace prokaryot se jedná o metodu ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) RFLP analýza genu pro 16S rRNA, která je někdy označována jako tzv. PCR ribotypizace. Princip metody spočívá v amplifikaci celého genu pro 16S rRNA (přibližně 1 600 bp) pomocí univerzálních primerů komplemen-

Tab. 1 Souhrn vlastností nejpoužívanějších genotypizačních metod založených na analýze DNA⁸

Metoda	Snadné použití	Snadná interpretace dat	Rozlišovací schopnost	Čas (dny)
RAPD	Lehké	průměrná	vysoká	1
RFLP	Lehké	lehká	průměrná	1
ARDRA	Lehké	lehká	vysoká	1
AFLP	průměrné	lehká	vysoká	2
PFG	průměrné	lehká	vysoká	3

Metoda	Intra-laboratorní reprodukovatelnost	Inter-laboratorní reprodukovatelnost	Vstupní náklady	Náklady na jeden test
RAPD	průměrná	špatná	průměrné	nízké
RFLP	Dobrá	dobrá	průměrné	nízké
ARDRA	Dobrá	dobrá	průměrné	nízké
AFLP	Dobrá	dobrá	vysoké	průměrné
PFG	Dobrá	dobrá	průměrné	průměrné

tárních ke koncovým sekvencím genu. S použitím vhodné restriční endonukleázy se pak získá spektrum několika fragmentů, které se stejně jako u předchozích metod liší svým počtem a velikostí v závislosti na bakteriálním druhu.

Nejdůležitějším a rozhodujícím krokem této metody je výběr vhodného restričního enzymu. I přesto, že se jedná o rozšířenou metodu nebyla dosud publikována žádná pravidla týkající se tohoto výběru. Nejčastěji se vychází z pravděpodobnosti, že pokud má restriční enzym např. 4bázovou rozpoznávací sekvenci a každá ze 4 bází se může se stejnou pravděpodobností nacházet na jakémkoliv místě této sekvence, pak pravděpodobnost výskytu enzymem rozpoznávané sekvence (restričního místa) je 4^4 , tedy každých 256 párů bází.

AFLP (amplified fragment length polymorphism)

Metoda AFLP⁹ zahrnuje celkem tři základní kroky: naštěpení genomické DNA a ligaci adaptorů na vzniklé fragmenty, amplifikaci fragmentů pomocí jednoho nebo dvou selektivních adaptorových primerů a gelovou elektroforézou amplifikovaných fragmentů. Následným zdokonalením metody použitím fluorescenčně značeného jednoho z primerů a separace vzniklých produktů na automatickém sekvenátoru¹⁰ učinilo z AFLP novou a velmi účinnou molekulární typizační metodou analyzující DNA libovolného původu, využívanou jak v diagnostice, tak pro fylogenetické a taxonomické studie, takže bylo jen otázkou času,

kdy se na trhu objeví komerčně dostupný „AFLP microbial fingerprinting kit“, který obsahuje již všechny potřebné reagenty.

PFGE (pulse field gel electrophoresis)

Pulzní gelová elektroforéza byla poprvé popsána v roce 1984 Schwartzem a Cantorem¹¹ jako nový způsob separace DNA v pulzním poli. Při separaci se využívá periodické změny elektrického proudu během elektroforézy. Její nezměrnou výhodou je zejména rozdělení velkých restričních fragmentů DNA (až 5 000 kb). K provedení je nutná speciální aparatura, která je schopna střídát elektrické pole mezi dvěma páry elektrod vzájemně orientovaných do pravého úhlu. PFGE je časově a finančně velmi náročná technika, nicméně umožňuje pracovat s celým genomem a je tak považována za jednu z nejlepších metod k přesnému taxonomickému zařazení až po kmenovou úroveň.

Závěr

I přesto, že analýza genů pro 16S rRNA, který je v současné době nejpoužívanějším univerzálním markerem, byla klíčovým faktorem v oblasti taxonomie bakterií, tak až rozvoj molekulárních DNA-typizačních technik se stal skutečným průlomovým mezníkem v analýze bakteriálního genotypu. Nezměrnou výhodou těchto technik je jejich univerzální použitelnost a schopnost dosáhnout maximálního rozlišení.

Literatura

1. Zuckerkandl, E., et al.: *J. Theor. Biol.*, 8, 357-366 (1965).
2. Woese, C.R., et al.: *Curr. Biol.*, 6, 1060-1063 (1996).
3. Woese, C.R., et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27, 44-57 (1977).
4. Daubin, V., et al.: *Genome Res.*, 12, 1080-1090 (2000).
5. Johansen, T., et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 136, 325-328 (1996).
6. <http://biologie.upol.cz/metody/> (5. 12. 2008).
7. Plachý, R., et al.: *J. Microbiol. Methods*, 60, 107113 (2005).
8. Olive, D.M. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1661-1669 (1999).
9. Vos, P. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 23, 4407-4414 (1995).
10. Šmarda, J. et al.: *Metody molekulární biologie*, 2005.
11. Schwartz, D.C., et al.: *Cell*, 37, 6775 (1984).

Souhrn

Tradiční metody identifikace mikroorganismů, založené převážně na sledování fenotypových projevů zkoumaných organismů, jsou stále důležitým zdrojem informací při charakterizaci nových bakteriálních druhů. V dnešní době však již existují moderní metody, díky kterým dokážeme nejenom přesněji určit jejich vzájemné fylogenetické vztahy, ale dosáhneme i maximální míry rozlišení mezi velmi příbuznými jedinci. Za zlatý standard se dnes v bakteriální taxonomii považuje sekvenování ribozomálních genů pro 16S nebo 23S rRNA. Důležitou roli hrají i jiné, zejména DNA-typizační metody (RAPD, RFLP, ARDRA, aj.) nebo pulzní gelová elektroforéza.

klíčová slova: identifikace bakterií, molekulární metody, 16S rRNA

Abstract

Traditional methods of identifying microorganisms based on investigation of phenotypic properties give us still useful information for the characterization of newly revealed species. Nevertheless, faster and more accurate method for identification has been recently established. These methods allow better determination of phylogenetic relationship and proper discrimination between closely related species. Sequencing of ribosomal genes for 16S and 23S rRNA has become widely accepted in the field of bacterial taxonomy. The important role play also other, mainly DNA-typing methods (RAPD, RFLP, ARDRA, etc.) or pulsed-field gel electrophoresis.

key words: identification of bacteria, molecular methods, 16S rRNA

METABOLISMUS PEKTINU U ANAEROBNÍCH BAKTERIÍ Z TRÁVICÍHO TRAKTU

Milan Marounek^{1,2}, Dagmar Dušková²

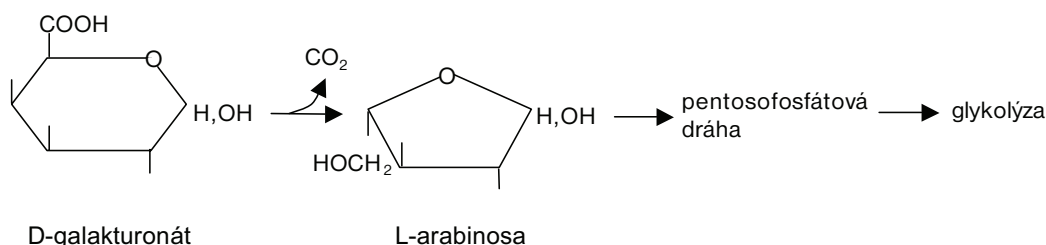
¹ Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Praha

² Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha

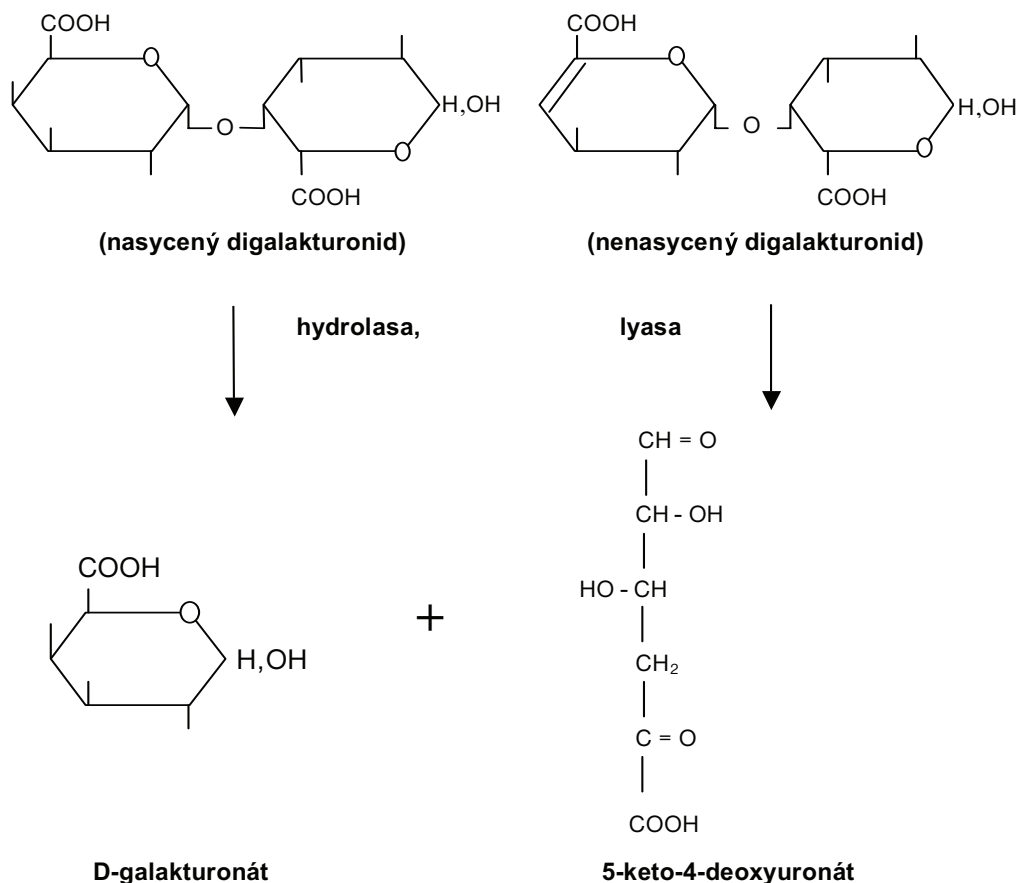
Úvod

Pektin patří k nejvíce rozšířeným látkám v živé přírodě. Podílí se tudíž na koloběhu uhlíku, má význam ve výživě lidí i zvířat a je důležitý v průmyslu potravinářském a textilním. Pektin je obsažen v zelených částech rostlin, kořenové zelenině i ovoci. Z toho důvodu je běžnou složkou potravy. Jeho základní monomerní jednotkou je kyselina D-galakturonová, převážně v podobě methylesteru, doprovázená dalšími sacharidy. Podobně jako další složky vlákniny, pektin není v trávicím traktu degradován endogenními enzymy, ale fermentován mikroorganismy. Fermentace spočívá

v odštěpení methanolu a rozkladu makromolekuly na oligogalakturonidy účinkem lyas a hydrolas. Di- a tri-galakturonidy prochází buněčnou stěnou a jsou bakteriemi metabolizovány intracelulárně. Účinkem lyas vznikají galakturonidy nenasycené. Intracelulárnímu metabolismu galakturonidů nebyla u mikroorganismů trávicího traktu věnována pozornost. V monografiích publikovaných v letech 1970, 1983 a 1997 autoři předpokládají, že kyselina galakturonová je dekarboxylována na L-arabinosu, která vstupuje do pentosofosfátové dráhy, jejíž meziproducty přechází do glykolýzy Obr. 1).



Obr. 1 Předpokládaný metabolismus kyseliny D-galakturonové.

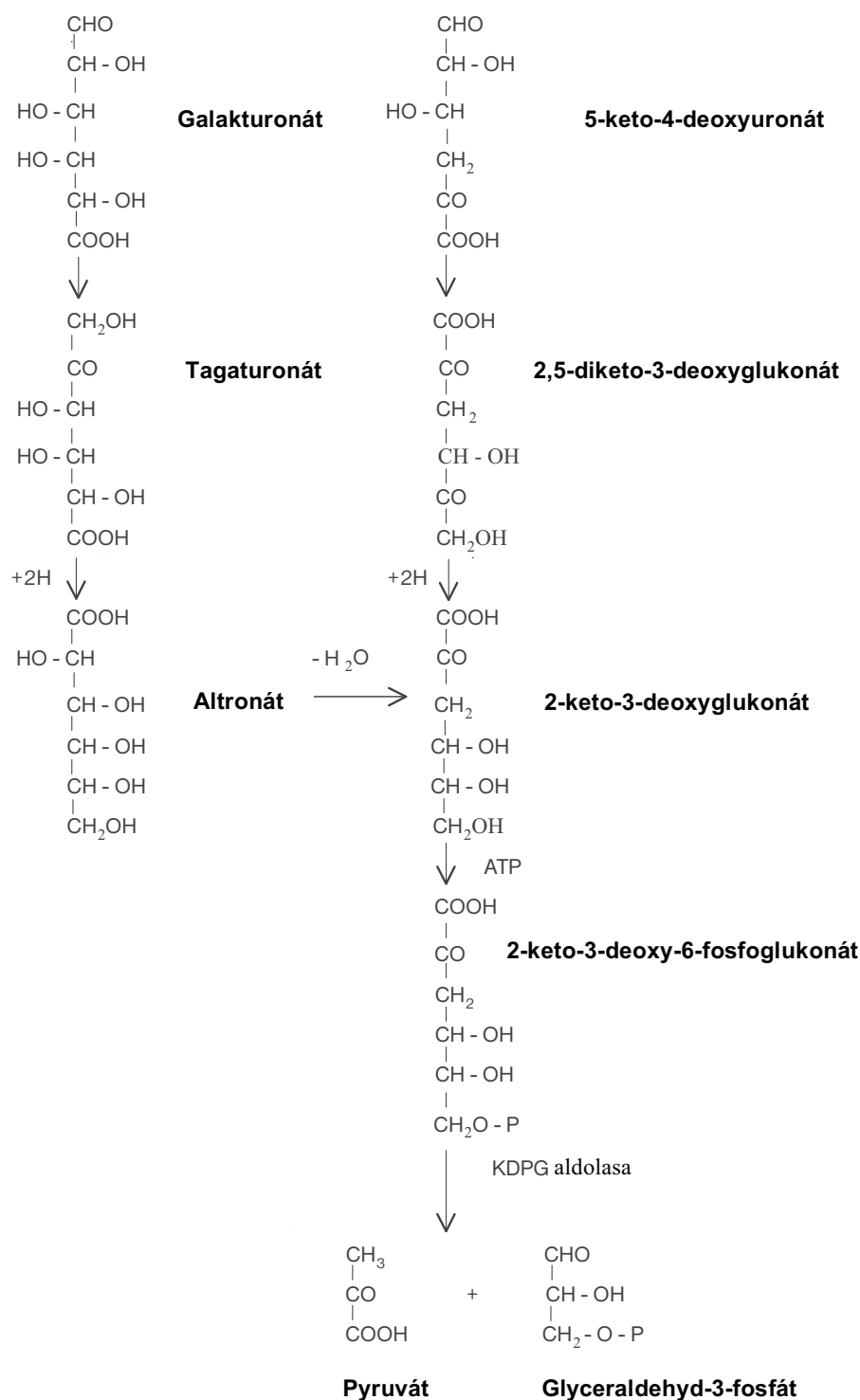


Obr. 2 Schéma štěpení pektinu.

Při zkouškách fermentace pektinu směsnými i čistými kulturami bachorových mikroorganismů jsme si však povšimli, že skladba metabolitů pektinu se značně odlišuje od metabolitů neutrálních monosacharidů a škrobu. Typické bylo vysoké zastoupení acetátu a nízké těch metabolitů, jejichž vznik z pyruvátu vyžaduje redukční ekvivalenty (laktát, propionát, butyrát, fumarát, sukcinát). Pokud by oxidovaná část molekuly kyseliny galakturonové byla ztracena dekarboxylací na samém začátku metabolické dráhy, pak by skladba metabolitů měla být podobná. Tato úvaha nutně vede k názoru, že podle uvedeného schématu, tj. přes L-ara-

binosu, metabolismus galakturonátu neprobíhá. Také je zřejmé, že metabolismu podléhají nejen nasycené, ale i nenasycené galakturonidy. Metabolismus galakturonidů byl nicméně objasněn v 60. letech u bakterií z jiných prostředí. Autoři tehdejších prací prokázali, že nasycený a nenasycený digalakturonid se hydrolasou a lyasou rozkládají na D-galakturonát a 5-keto-4-deoxyuronát Obr. 2).

Oba uronáty se přeměňují metabolickou drahou Entner-Doudoroff na 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonát (KDPG), který se štěpí aldolasou na pyruvát a glyceraldehyd-3-fosfát (Obr. 3). Konvenční metabo-



Obr. 3 Přeměna uronových kyselin.

lická dráha Entner-Doudoroff byla známa již dříve, od roku 1952, např. u *E. coli*. V ní je glukosa oxidována na glukonát, z něhož dehydratací vzniká 2-keto-3-deoxyglukonát a dále již podle níže naznačeného schématu.

Uskutečněná měření

K průkazu existence této dráhy u pektinolytických bakterií z fermentačních oddílů trávicího traktu jsme zjišťovali aktivitu 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonát aldolasy (KDPG aldolasy, EC 4.1.2.14), která je pro tuto dráhu specifická. Aktivitu jsme měřili stanovením tvorby pyruvátu v reakční směsi buněčného extraktu a KDPG. KDPG není komerčně dostupný, proto jsme jej připravili (dle návodu z literatury) z pyruvátu a glycerinaldehyd-3-fosfátu kondenzací katalyzovanou extraktem z *Pseudomonas fluorescens*. Poslední krok dráhy Entner-Doudoroff je vratný a probíhá opačně při přebytku pyruvátu. Buněčné extrakty jsme připravovali z bachorových bakterií *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella* (dříve *Bacteroides*) *ruminicola* a *Lachnospira multiparus*. Dále z bakterií *Bifidobacterium pseudolongum* a *Bacteroides caccae* ze slepého střeva králíků. Vzniku pyruvátu glykolýzou jsme bránili přidavkem jodacetátu a utilizaci pyruvátu přidavkem arsenitanu. Kontrolami byla reakční směs bez KDPG a reakční směs bez buněčného extraktu. Pro kontrolu jsme také měřili aktivitu KDPG aldolasy u bakterie *Bifidobacterium* sp., která na pektinu nerostla a u bakterie *Streptococcus bovis*, která pektin rozkládala, ale produkty štěpení nevyužívala. Naměřené aktivity KDPG aldolasy při růstu na pektinu (u pseudomonady na glukose) byly následující (nmol pyruvátu/min.mg proteinu, průměry tří a více kultur):

<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	7871073
<i>Prevotella ruminicola</i>	AR491106
<i>Lachnospira multiparus</i>	ATCC 192071178
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	P6919
<i>Bacteroides caccae</i>	KWN662
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DBM 3056556

Naměřené aktivity byly poměrně vysoké a s měřením vzniklého pyruvátu (HPLC) nebyl problém. Aktivitu KDPG aldolasy jsme nenalezli u bifidobakterie, která na pektinu nerostla a u *S.bovis*, který produkty rozkladu pektinu nevyužíval. Vyjma pseudomonady, u žádné ze zkoušených bakterií nevznikal v reakční směsi pyruvát byl-li KDPG nahrazen 6-fosfoglukonátem. To ukazuje, že fosfoglukonátdehydratasa (EC 4.2.1.12), která z fosfoglukonátu tvoří KDPG, nebyla v buněčných

extraktech přítomna. V důsledku toho konvenční dráha Entner-Doudoroff utilizace glukosy nemůže u těchto bakterií probíhat.

U bachorových bakterií jsme i při růstu na pektinu zjistili aktivitu fruktosodifosfátaldolasy (EC 4.1.2.13), charakteristického enzymu glykolýzy. Při růstu na pektinu pektinolytické bakterie glykolýzu potřebují pro utilizaci neutrálních sacharidů, v pektinu běžně obsažených.

Popis metabolismu pektinu by nebyl úplný, kdybychom se nezmínili o enzymech odbourávajících molekulu pektinu, o depolymerasách. Nepřekvapuje, že jejich aktivita v supernatantu kultur byla daleko větší než v extraktu buněk, protože působí extracelulárně. U *L.multiparus* dominovala aktivita lyasy, u *B. caccae* byly aktivity lyasy a hydrolasy podobné a u *B. pseudolongum* byla zjištěna jen aktivita hydrolasy. U *B. caccae* jsme také zjišťovali způsob ataku molekuly pektinu, zda je terminální nebo „random“, tj. uprostřed řetězce. Ve směsi roztoku pektinu a supernatantu kultury jsme měřili viskozitu, tvorbu redukujících cukrů a nenasycených produktů, absorbujících UV světlo (232 nm). Při štěpení řetězce náhodným způsobem klesá viskozita roztoku a koncentrace redukujících cukrů či látek absorbujících UV světlo se zvyšuje nepatrně. Při odbourávání molekuly od konce je viskozita stálá a naproti tomu zřetelně roste koncentrace redukujících cukrů či látek absorbujících UV světlo. Bylo zřejmé, že hydrolasa u této bakterie odštěpuje galakturonidy od konce, zatímco lyasa štěpí glykosidické vazby náhodně.

Závěr

Uvedené výsledky lze shrnout do konstatování, že anaerobní pektinolytické bakterie z fermentačních oddílů trávicího traktu využívají modifikovanou Entner-Doudoroffovu dráhu k metabolismu nasycených i nenasycených galakturonidů, stejně jako pektinolytické pseudomonady a fytopathogenní *Erwinia carotovora*. Platí to i pro bifidobakterie u nichž je metabolismus hexos velmi specifický. Soudí se, že konvenční Entner-Doudoroffova dráha je starší než glykolýza, která původně sloužila (v obráceném směru) ke glukoneogenezi. Štěpení makromolekuly pektinu je naproti tomu méně uniformní. Podílí se na něm hydrolasy i lyasy, štěpící molekulu od konce i uprostřed, dále pektinesterasa a glykosidasy hydrolyzující vazby neutrálních sacharidů.

Popsané pokusy souvisely s řešením projektů AVOZ 50450515, MZE 0002701403 a GAČR 525/03/0358.

Literatura

1. Phillipson A.T.: Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant, Newcastle u.T., Oriel Press, 1970.
2. Van Soest P.J.: Nutritional Ecology of the Ruminant, Orvallis, O&B Books, 1983.

3. Mackie R.I., White B.A.: Gastrointestinal Microbiology, Vol. 1, New York, International Thomson Publishing, 1997.

Souhrn

U anaerobních pektinolytických bakterií z bacheru a slepého střeva králíků jsme zjišťovali aktivitu enzymů, které se podílejí na metabolismu pektinu. Použili jsme bacherové bakterie *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Lachnospira multiparus* a bakterie ze slepého střeva králíků *Bacteroides caccae* a *Bifidobacterium pseudolongum*. Depolymerasami pektinu jsou jak hydrolasy a lyasy, které degradují makromolekulu náhodným způsobem, nebo uvolňují mono- a digalakturonáty od jejího konce. Digalakturonáty jsou katabolizovány intracelulárně na uronáty, které jsou dále metabolizovány modifikovanou Entner-Doudoroffovou dráhou. Zkoušené pektinolytické bakterie měly vysokou aktivitu 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonátaldolasy, která je pro tuto dráhu specifická. Konvenční Entner-Doudoroffova dráha metabolismu glukosy u těchto bakterií není funkční. Neutrální sacharidy, které pektin obsahuje, jsou metabolizovány glykolyticky.

klíčová slova: pektin, metabolismus, anaerobní bakterie, bacher, slepé střevo

Abstract

In anaerobic pectinolytic bacteria from the rumen and rabbit caecum the activities of enzymes involved in pectin metabolism were assayed. Rumen bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Lachnospira multiparus* and caecal bacteria *Bacteroides caccae* and *Bifidobacterium pseudolongum* were used. Depolymerases of pectin include both hydrolases and lyases that degrade the macromolecule in a random fashion, or liberate mono- and digalacturonates by a terminal attack on the polymer. Digalacturonates are catabolized intracellularly to uronates that enter a modified Entner-Doudoroff pathway. All pectinolytic bacteria studied possessed 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase activity, an enzyme specific for the Entner-Doudoroff pathway. The conventional Entner-Doudoroff pathway of glucose metabolism, however, does not operate in these bacteria. Neutral sugars present in pectin are metabolized via glycolysis.

key words: pectin, metabolism, anaerobic bacteria, rumen, caecum

ISOLACE, DETEKCE A CHARAKTERISACE CAMPYLOBACTER SP.

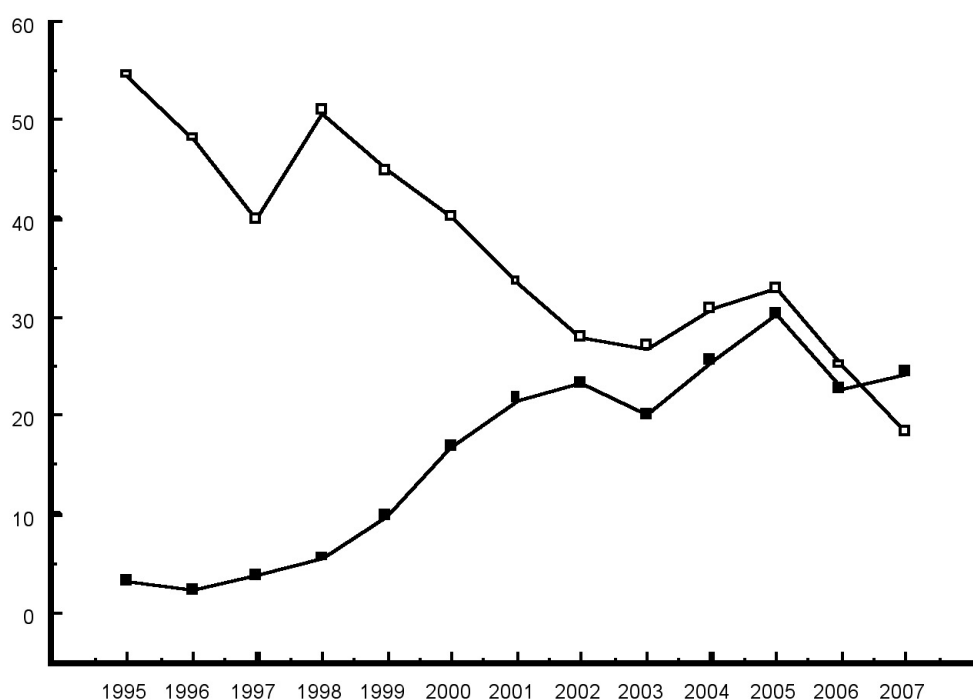
Igor Hochel, Miroslava Matúšová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

1. Úvod

Termotolerantní bakterie rodu *Campylobacter* se v posledních více jak deseti letech stávají významnými původci alimentárních nákaz v Evropě, USA a dalších rozvinutých zemích. Např. v roce 2005 bylo v celé Evropské unii zaznamenáno 195 426 potvrzených případů campylobakterios [1]. V řadě zemí počet přípa-

dů onemocnění vyvolaných campylobakteriemi přerostl počet enteritid způsobených salmonelami [2, 3]. Prudký nárůst campylobakterios byl zaznamenán od konce 90 let minulého století až do roku 2005 také v České republice (Obr. 1). Campylobakterie byly původně zařazeny do rodu *Vibrio*. V roce 1914 Tunicliff pozoroval mikroorganismus, později klasifikovaný jako



Obr. 1. Počet případů onemocnění způsobené bakteriemi rodu *Campylobacter* a *Salmonella* v České republice v letech 1995-2007: ■ campylobacteriosy, □ salmonelozy

Zdroj: <http://www.szu.cz/data/infekce-v-cr>

V. sputorum ve sputu pacienta trpícího bronchitidou [4, 5]. V roce 1918 Smith označil spirálovitou bakterii za původce abortů u skotu a o rok později spolu s Taylorem popsali morfologické a biologické vlastnosti nového mikroorganismu, který nazvali *Vibrio fetus* [6, 7]. Jones a Little zkoumali, původce zimní dysenterie telat, kterého pojmenovali *Vibrio jejuni* a Doyle klasifikoval podobný mikroorganismus, vyvolávající dysenterii prasat, jako *V. coli* [8, 9]. Avšak, teprve Vinzent et al. prokázali patogenitu těchto nových vibrií tím, že úspěšně izolovali *V. fetus* z krve gravidních žen, postižených dlouhodobým horečnatým onemocněním s následným spontánním potratem [10]. V roce 1957 Kingová našla v krvi pacienta mikroorganismus, který morfologicky odpovídal druhu *V. fetus*, avšak který se odlišoval svými biochemickými a antigenními vlastnostmi [11]. Toto nové species označila termínem 'related vibrio'. Počet infekcí prokazatelně způsobených touto bakterií byl vzhledem k nedostatečně účinným izolačním technikám, až do začátku 70 let nízký. V r. 1963, na základě stanovení obsahu guaninu a cytosinu v molekule DNA a podle biochemických charakteristik navrhli Sebald a Véron začlenit *V. fetus* a *V. bubulus* do nového rodu *Campylobacter* [12]. O deset let později Véron a Chatelain vypracovali komplexní taxonomii tohoto rodu a definovali 4 druhy: *C. fetus*, *C. coli*, *C. jejuni* a *C. sputorum* [13]. Rod *Campylobacter* byl postupně rozšiřován a revidován, a v roce 1991 Vandamme a De Ley navrhli vytvořit novou čeleď *Campylobacteriaceae* [14]. Současná taxonomie zahrnuje do této čeledi 3 rody: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* a nesprávně pojmenovaný druh *Bacteroides ureolyticus*. Samotný rod *Campylobacter* je tvořen 18 více či méně genotypicky homologními druhy: *Campylobacter canadensis*, *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *veneralis*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*, *C. insulaenigrae*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* bv. *Faecalis*, *C. sputorum* bv. *Sputorum* a *C. upsaliensis*.

2. Morfologické a biochemické vlastnosti a metabolismus *Campylobacter* sp.

Buňky většiny druhů kampylobakterií jsou spirálovité, nebo zakřivené gram negativní tyčinky, o rozměrech 0,2-0,8 x 0,5-5 μm. Tyčinky mohou vytvářet jednu nebo více smyček. Ve starých kulturách přecházejí spirálovité buňky na kokoidní formu. K těmto morfologickým změnám dochází pravděpodobně v důsledku enzymové degradace peptidoglykanové vrstvy [15]. Buňky netvoří spory. Většina druhů je pohyblivá a to prostřednictvím polárního bičíku na jednom, nebo obou koncích buňky. Ostatní druhy, jako je *C. gracilis*, jsou nepohyblivé, nebo jsou naopak vybaveny mnohonásobnými bičíky (*C. showae*). Příležitostně může být u druhu *C. hyointestinalis* pozorována difference v počtu bičíků.

Kampylobakterie jsou chemoorganotrofní mikroorganismy, které nejsou schopny fermentovat ani oxidovat sacharidy. Energií získávají z metabolismu aminokyselin a z metabolismu intermediátů trikarboxylových kyselin. Nehydrolyzují tyrosin, kasein, škrob, ani želatinu. Test na produkci acetoinu (Voges-Proscauer) a test na methylcerveně jsou negativní. S výjimkou *C. gracilis* a některých kmenů *C. concisus* a *C. showae* vykazují oxidasovou aktivitu. Redukují dusičnany, avšak nikoliv dusitany. *C. jejuni* a některé kmeny *C. curvus* jsou schopny hydrolyzovat hipurát. Tohoto testu se v diagnostice používá k diferenciaci klinicky nejvýznamnějších druhů *C. jejuni* a *C. coli*. Žádné species nevytváří pigmenty. Obsah guaninu a cytosinu v molekule DNA se pohybuje v rozmezí od 29 do 47 mol %.

Optimální růstová teplota je 35-37 °C, růst termofilních druhů je při izolaci kampylobakterií zvýhodněn kultivací při teplotě 42-43 °C. Všechny kampylobakterie rostou za mikroaerofilních podmínek s koncentrací kyslíku v rozmezí 3-15 %. Druhy *C. concisus*, *C. curvus*, *C. gracilis*, *C. rectus*, *C. mucosalis* a *C. showae* vyžadují pro mikroaerobní růst, jako donor elektronů, přítomnost mravenčanu, nebo vodíku. V buňkách *Campylobacter* sp. byla zjištěna přítomnost cytochromu *b* a *c*, přítomnost cytochromu *o* je nejistá [16-18]. Hlavními respiračními chinony jsou menachinon-6 a jeho derivát alkylovaný v pozici 6 [19-21].

3. Klinické projevy onemocnění způsobené kampylobakteriemi, výskyt a způsob přenosu

Kampylobakterie jsou mikrobiálními patogeny člověka a zvířat. Jsou identifikovány jako agens, které vyvolává u člověka akutní průjemová onemocnění, zvláště pak u dětí jak v průmyslově rozvinutých, tak rozvojových zemích. Enteritis vyvolaná kampylobakteriemi vykazuje podobné symptomy jako onemocnění vyvolané salmonelami, nebo shigelami. Jednoznačná diagnosa může být učiněna pouze detekcí kampylobakterií v klinickém materiálu. Mezi nejvýznamější patogeny se řadí termofilní druhy *C. jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis* a druh *C. fetus* subsp. *fetus*. Nebude-li uvedeno jinak bude se následující text týkat převážně termofilních kampylobakterií

Kampylobakteriosa vyvolaná *C. jejuni* nebo *C. coli* je choroba, která se projevuje, po 1-7 dnech inkubace, bolestmi břicha následované průjmy. Postižení mohou vykazovat další nespecifické příznaky jako je horečka, bolest hlavy, závrať, myalgie, popř. zvracení. Bolest břicha se může stávat nepřetržitou, intenzivní a může se šířit do pravé jámy kyčelní a tak komplikovat diagnosu. Po 1 až 2 dnech onemocnění se u 15 % pacientů objevuje ve stolici krev. Podle některých studií je viditelná přítomnost krve ve stolici v případě kampylobakterios častější než u salmonelos a shigelos [22, 23]. Přibližně po 3 až 4 dnech onemocnění průjem ustupuje a stav postiženého se začíná zlepšovat i když bolesti břicha mohou přetrvávat ještě několik dalších dní. Recidiva byla zaznamenána u 15-25 % pacientů [24, 25]. Ztráta hmotnosti až 5 kg je běžný důsledek onemocnění.

Průběh onemocnění u dětí je poněkud odlišný. Horečka se často nevyskytuje, naopak zvracení je časté. Až u 92 % infikovaných dětí ve věku do 1 roku se objevuje krev ve stolici [26].

Většina pacientů postižených kampylobakteriosou nevyžaduje zvláštní lékařské ošetření, pouze musí být doplňovány tekutiny a elektrolyty, aby se tak zabránilo dehydrataci organismu. Jen ve vážných případech, u akutně nemocných bez známek zlepšení a při léčbě imunodeficientních pacientů se uplatňuje léčba antibiotiky. Úspěšně se aplikuje erythromycin [27], vzhledem k nízké úrovni rezistence kampylobakterií a jeho nízké toxicitě. V případě vážných systémových infekcí se také nasazují aminoglykosidy (gentamicin, imipenem).

Ačkoliv vlastní kampylobakteriosa není obvykle život ohrožující onemocnění závažnější jsou komplikace popř. postinfekční následky jako je apendicitis [28, 29], colitis [30, 31], erythema nodosum u žen [32, 33], masivní střevní krvácení [34], bakterémie zvláště u pacientů s oslabeným imunitním systémem [35-37], hepatitis [38], pankreatitis [39], cholecystitis [40] potrat [41-43], hemolyticko-uremický syndrom [44], reaktivní artritida a Reiterův syndrom [45-47] a Guillain-Barré syndrom (GBS) [48-50]. GBS je zánětlivá polyneuropatie způsobující neuromuskulární paralysu. Klinicky se syndrom projevuje smyslovými poruchami, bolestí, rychle postupující slabostí dolních a horních končetin, ochabnutím dýchacích svalů, popř. svalovou paralysou. Přibližně 20 % pacientů je závislých na asistovaném dýchání pomocí přístrojů, 40 % je upoutáno na lůžko, 20 % je schopno chůze s asistencí, 10 % je schopno chůze, ale nikoli běhu a pouze 10 % postižených vykazuje mírné symptomy [51]. Podle různých studií 13-72 % pacientů trpících GBS prodělalo infekci způsobenou *C. jejuni* [52]. Až v 30 % případů má GBS po kampylobakteriose závažný průběh, tzn. že se objevuje quadroplegie a ventilační závislost během 24-48 h po indikaci prvních příznaků [52]. Post-infekční GBS vzniká v důsledku křížové interakce protilátek proti povrchovým lipooligosacharidům *C. jejuni* s gangliosidy GM1, GD1a, GD3, GT1a popř. GQ1b. S rozvojem GBS jsou spojovány především serotypy O:19 a O:41, ale i další jako O:1, O:2, O:4, O:4 komplex, O:5, O:10, O:16, O:23, O:37, O:44 a O:64 (Pennerovo serotypizační schema) [53-55]. Onemocnění vyvolaná jednotlivými druhy rodu *Campylobacter* jsou uvedena v Tab. I.

Kampylobakterie se vyskytují ve střevním traktu mnoha volně žijících i domácích zvířat a ptáků [56-59]. Člověk se nejčastěji nakazí konzumací kontaminovaných potravin, vody [60] a syrového, nebo nedostatečně pasterizovaného mléka [61]. *Campylobacter* sp. byl izolován z drůbežího, hovězího a vepřového masa a masných výrobků [62, 63], ústřic, slávek, hřebenatek a krabů [63-65], hub [63] a zeleniny [66]. Maso a masné výrobky jsou obvykle kontaminovány v průběhu porážky a následného zpracování masa [67, 68]. Kampylobakterie jsou citlivé na zvýšené teploty, avšak jsou schopny přežít v potravinách při teplotách nižších než 0 °C až po dobu 112 dní. Infekce

proto může být způsobena manipulací a konzumací nedostatečně tepelně ošetřených potravin a kontaminací potravin, které nebyly tepelně upraveny [69] avšak může být šířena nejen kontaminovanými potravinami, ale i přímým kontaktem s infikovanými zvířaty [70], nebo přenosem z člověka na člověka [71].

4. Isolace kampylobakterií

Isolace kampylobakterií je možné provádět jednak filtrační metodou, nebo kultivací na selektivním médiu. Filtrační metody jsou používány především pro testování klinického materiálu, který je bohatý na vitální buňky kampylobakterií. Sterilní filtr s pory o velikosti 0,65, nebo 0,45 µm je umístěn na neselektivní popř. selektivní krevní agar. Na filtr se aplikuje 10-12 kapek vzorku emulzifikovaného ve fyziologickém roztoku. Využívá se tak pohyblivosti kampylobakterií, které procházejí pory filtru a separují se od ostatní mikroflory [72, 73]. Jinou alternativní filtrační metodou je aplikace membránových filtrů Sartorius. Po přefiltrování vzorku se filtrát aplikuje na neselektivní, nebo selektivní růstové médium [74]. Kultivace se provádí za mikroaerofilních podmínek, izolace H₂ dependentních druhů probíhá v atmosféře obsahující 15% CO₂ a 85 % H₂.

Další možností izolace kampylobakterií je aplikace selektivních médií. Metoda se uplatňuje nejen při zpracování klinického materiálu, ale také při izolaci *Campylobacter* sp. z potravin a potravinářských surovin, vody a vzorků životního prostředí. Protože vzorky potravin a vzorky životního prostředí obsahují jen nízké počty buněk kampylobakterií, většinou stresovaných popř. sublethálně poškozených, je nezbytné provádět nabohacování kultur. Kampylobakterie jsou nutričně náročné a citlivé na přítomnost kyslíku v růstovém médiu. Selektivní a nabohacovací média proto musí nejen splňovat tyto nutriční nároky, ale musí obsahovat nezbytná zhášedla kyslíkových radikálů (krev, aktivní uhlí). Byly popsány různé kultivační půdy využívající krevní agar popř. agar bez přítomnosti krve jako basální médium. Jako selektivní agens jsou využívány různé směsi antibiotik [75-82]. Avšak, žádné z těchto médií nepodporuje růst všech druhů kampylobakterií.

Inkubace zaočkovaných půd při teplotě 42-43 °C podporuje růst termofilních kampylobakterií a inhibuje růst většiny doprovodné mikroflory. Na druhé straně však bude potlačen růst některých druhů mezofilních kampylobakterií. Isolace mezofilních druhů je náročnější, vzorky se kultivují při teplotě 37 °C, obvykle s prodlouženou dobou kultivace.

V České republice je pro izolaci a průkaz termofilních kampylobakterií ve výrobcích určených k lidské výživě, nebo ke krmení zvířat, platná norma ČSN ISO 10272-1 *Mikrobiologie potravin a krmiv – horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Campylobacter spp.* Testovaný vzorek se suspenduje do bujonu podle Boltona, které obsahuje cefoperazon, vankomycin, trimetoprim a amfotericin B, v poměru 1:10 a kultivuje se za mikroaerofilních podmínek při teplotě 37 °C

Tab. I. Onemocnění vyvolaná, nebo indukovaná jednotlivými druhy rodu *Campylobacter*

Druh	Zdroj	Onemocnění	
		Člověk	Zvířata
<i>C. canadensis</i>	jeřáb bělohřbetý	?	?
<i>C. coli</i>	prase, drůbež, skot, ovce ptáci	gastroenteritis, septikémie	gastroenteritis
<i>C. concisus</i>	člověk	periodontal disease,	gastroenteritis žádné
<i>C. curvus</i>	člověk	periodontal disease,	gastroenteritis žádné
<i>C. fetus subsp fetus</i>	skot, ovce	gastroenteritis, septikémie, potrat	spontánní aborty skotu a ovčí
<i>C. fetus subsp venerealis</i>	skot	septikémie	infekční sterilita skotu
<i>C. gracilis</i>	člověk	periodontal disease, empyema, absces	žádné
<i>C. helveticus</i>	kočka, pes	žádné	gastroenteritis
<i>C. hominis</i>	člověk	gastroenteritis	?
<i>C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis</i>	prase, skot, křeček, vysoká zvěř	gastroenteritis	enteritis prasat a skotu
<i>C. hyointestinalis subsp. lawsonii</i>	prase	žádné	?
<i>C. isulaenigrae</i>	tuleň, sviňucha	žádné	žádné
<i>C. jejuni subsp. doylei</i>	člověk	gastroenteritis, gastritis, septikémie	žádné
<i>C. jejuni subsp. jejuni</i>	drůbež, prase, skot, ovce pes, kočka	gastroenteritis, septikémie, meningitis, potrat, proctitis, Guillain-Barré syndrom	gastroenteritis, hepatitida ptáků
<i>C. lanienae</i>	skot, prase, člověk	žádné	žádné
<i>C. lari</i>	ptáci, pes, kočka, opice, koně, tuleň, voda	gastroenteritis, septikémie	gastroenteritis ptáků
<i>C. mucosalis</i>	prase	žádné	nekrotizující enteritis a ileitis prasat
<i>C. rectus</i>	člověk	periodontal disease	žádné
<i>C. showae</i>	člověk	periodontal disease	žádné
<i>C. sputorum</i> bv. Faecalis	ovce, skot	žádné	žádné
<i>C. sputorum</i> bv. Sputorum	člověk, skot, prase	gastroenteritis, absces	žádné
<i>C. upsaliensis</i>	pes, kočka	gastroenteritis, septikémie, absces	gastroenteritis psů a koček

po dobu 4-6 h a poté při teplotě 41,5 °C po dobu 44-48 h. Pomnožená kultura se vyočkuje na desoxycholatový agar s aktivním uhlím, cefoperazonem a amfotericinem B a na druhé volitelné médium (modifikovaný agar podle Butzlera, agar podle Skirrowa, agar podle Karmaliho, agar podle Prestona) a to proto, aby se zvýšila pravděpodobnost zachytu požadovaného mikroorganismu. Plotny se inkubují za mikroaerofilních podmínek při teplotě 41,5 °C po dobu 44-48 h. Z každé plotny se vybere 5 charakteristických kolonií a provedou se předběžné testy. Suspektní kolonie jsou pak dále charakterisovány pomocí předepsaných biochemických testů.

5. Rychlé metody detekce termofilních kampylobakterií

5.1 Imunochemické metody

Imunochemické metody představují alternativní techniky detekce kampylobakterií v různých typech vzorků. Výhodou těchto metod je jejich jednoduchost, nízké náklady a možnost testovat velký počet vzorků. Jsou založeny na interakci antigenu se specifickou protilátkou. Aglutinační reakce se stala základem několika komerčně dostupných testů. Všechny využívají latexových částic s imobilisovanými imunoglobuliny, které byly připraveny proti: 1) antigenům různým druhů rodu *Campylobacter* tj. *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* a *C. fetus* subsp. *fetus* (Campyslide, BBL Microbiology System); 2) různým sérotypům *C. jejuni* (Microscreen, Mercia Diagnostics); 3) flagelárnímu antigenu *C. jejuni* (Meritec-Campy, Meridian Diagnostics). Hodinka a Gilligan prokázali, že Campyslide pozitivně reagoval s 110 izoláty kampylobakterií, avšak vykazoval rovněž křížové interakce s některými kmeny *Pseudomonas aeruginosa* [83]. Nachamkin a Barbagallo testovali systém Meritec-Campy, který reagoval se všemi 77 kmeny *C. jejuni*, 17 kmeny *C. coli* a 2 kmeny *C. upsaliensis*, avšak selhal při detekci 6 kmenů *C. lari* a 3 kmenů *C. fetus* subsp. *fetus* [84]. Další autoři testovali komerční test Microscreen a zjistili, že systém reaguje s kmeny druhu *C. jejuni* a *C. coli*, avšak také poskytuje slabou odezvu s ostatními druhy rodu *Campylobacter* a *Helicobacter*, pokud je koncentrace buněk ve vzorku vyšší než 10^5 cfu·ml⁻¹ [85]. Komerčně dostupné aglutinační testy byly použity pro detekci kampylobakterií v kuřecím mase [86]. Falešně negativní výsledky byly pozorovány u vzorků s vysokou koncentrací doprovodné mikroflory v nabohacovacím médiu.

Byly připraveny protilátky pro detekci a identifikaci pouze určitých druhů kampylobakterií. Taylor a Chang připravili specifickou protilátku proti hlavnímu proteinu vnější membrány (OMP) *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* a *C. upsaliensis*. Jako detekční systém využili autoři metody imunoblotu a ELISA [87]. Lu et al., připravili monoklonální protilátky proti *Campylobacter jejuni* sérotypu

6 (Lior). Tyto protilátky reagovaly se všemi testovanými kmeny *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari*. Rozpoznávanou buněčnou komponentou byl vždy jeden protein a to: flagelin (62 kDa), protein bičíkového háčky (92 kDa) a protein o molekulové hmotnosti 31 kDa. Autoři rovněž vyvinuli nepřímou kompetitivní metodu ELISA. Detekční limit stanovení se pohyboval v rozmezí 10^5 - 10^7 cfu·ml⁻¹ [88]. V další studii byly popsány čtyři monoklonální protilátky proti základnímu řetězci (core) lypopolysacharidů *C. fetus*. Jedna protilátka reagovala se všemi 42 kmeny *C. fetus*, ostatní protilátky pak reagovaly s 41 kmeny testovaného souboru. Všechny monoklonální protilátky reagovaly jak se sérotypem A tak se sérotypem B. Autoři použili připravené preparáty k vývoji nepřímé ELISA. Dosažené detekční limity se lišily podle použité protilátky a pohybovaly se v rozmezí 10^4 - 10^7 cfu·ml⁻¹ [89]. Hochel et al., připravili králíčí IgG a slepičí IgY proti *C. jejuni* O:23 (Penner) *C. coli* a *C. fetus* subsp. *fetus* a vyvinuli nepřímou kompetitivní ELISA. Králíčí protilátky byly specifické, slepičí IgY proti *C. jejuni* O:23 vykazovaly křížové interakce s kmeny *C. jejuni* sérotyp O:3, O:9 (Penner) a sérotypy 10, 18 a 22 (Kahlich). Další křížové interakce byly pozorovány s druhem *C. upsaliensis* a *C. sputorum* bv. Sputorum. Byly pozorovány také slabé křížové reakce IgY proti *C. fetus* subsp. *fetus* s kmeny *C. fetus* subsp. *veneralis*. Detekční limity enzymového imunochemického stanovení se pohybovaly v rozmezí $0,3$ - $3,2 \cdot 10^6$ cfu·ml⁻¹ pokud byly použity králíčí IgG, nebo v rozmezí $0,5$ - $1,8 \cdot 10^5$ cfu·ml⁻¹ v případě využití IgY [90, 91]. Autoři testovali vyvinuté ELISA techniky na limitovaném počtu přirozeně a uměle kontaminovaných vzorcích potravin a dosažené výsledky porovnali s výsledky získanými standardní kultivační metodou, PCR a komerčně dostupným testem Singlepath *Campylobacter* Rapid Test (Merck). Horák a Hochel použili magnetické poly(glycidyl methakrylátové) částice s kovalentně vázanými slepičími IgY při vývoji metody ELISA pro detekci *Campylobacter jejuni*. Detekční limit metody byl $4,8 \cdot 10^6$ cfu·ml⁻¹ [92].

Na principu enzymového imunochemického stanovení jsou založeny i další komerčně dostupné testy VIDAS *Campylobacter* kit (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francie) pro detekci *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari* a EIA-Foss *Campylobacter* enzyme-immunosorbent assay kit (Foss Electric, Dánsko) pro detekci *C. jejuni* a *C. coli*. Hoofar et al., testovali VIDAS *Campylobacter* kit (EIA-1) a EIA-Foss *Campylobacter* enzyme-immunosorbent assay kit (EIA-2) na vzorcích výkalů skotu a prasat. Citlivost EIA-1 95 % (skot) a 84 % (prasata), citlivost EIA-2 dosáhla hodnot 88 % (skot) a 69 % (prasata). Avšak při studiu specifity dosáhl test EIA-2 pouze 32 % [93]. Bailey et al., porovnali Tecra *Campylobacter* Visual Immunoassay (TCVIA) s kultivačními metodami detekce kampylobakterií v 350 vzorcích kuřat. TCVIA poskytla u 317 vzorků pozitivní výsledek, z toho 4 výsledky byly falešně pozitivní a 22 bylo falešně negativních. Pomocí kultivačních metod se podařilo zjistit přítomnost mikroorganismu v 280 vzorcích, 48 vzorků bylo

falešně negativních [94]. Jiná skupina testovala komerčně dostupnou soupravu ProSpecT Microplate Assay na 1205 klinických vzorcích. Nebyly prokázány křížové interakce s doprovodnou mikroflorou. Specifita stanovení byla 97,7 % a citlivost 89,1 % [95]. Wei et al., použili 4 komerčně dostupné protilátky při vývoji SPR senzoru založeném na povrchové plasmónové resonanci. Vyvinutý systém byl vysoce specifický k druhu *C. jejuni*. Detekční limit dosáhl hodnoty 10^3 cfu ml⁻¹ v čisté kultuře i ve vzorcích kuřecího masa [96].

Specifické protilátky mohou být využity nejen pro přímou detekci, ale také pro separaci patogenního mikroorganismu ze vzorku. Yu et al., použili magnetické částice s imobilizovaným streptavidinem, na které navázali komplex biotinu a protilátky proti *C. jejuni*. Takto aktivované částice byly smíchány s homogenizovaným vzorkem. Poté byly magnetické částice odděleny od vzorku a aplikovány na Karmaliho agar. Pomocí této metody bylo možné detegovat 10^4 buněk *C. jejuni* v 1 g vzorku [97]. Aby zabránili inhibici polymerázové řetězcové reakce komponentami vzorku použili Docherty et al. magnetické částice s imobilizovanou specifickou protilátkou na separaci buněk kampylobakterií od matrice vzorků mléka a kuřecího masa [98].

5.2 Molekulárně biologické metody

Molekulárně biologické metody založené na řetězové polymerasové reakci (PCR) jsou v současné době široce využívány jak pro detekci kampylobakterií v různých typech vzorků, tak pro další charakterisaci izolovaného mikroorganismu. PCR metody jsou založeny na multiplikaci krátkého fragmentu bakteriálního genomu. Vzniklý produkt je pak separován a visualisován pomocí elektroforesy na agarosovém gelu. Podle požadované specifity mohou být využity různé oblasti genomu. Je-li požadována detekce pouze na úrovni rodu využívají se vysoce konzervativní úseky 16S rRNA, v případě požadavku na rozpoznání jednotlivých druhů se využívají druhově specifické geny. Např. pro detekci *C. jejuni* byly použity amplikony genu *HipO* pro hippurikasu [99] nebo *mapA* pro membránový protein A [100]. Birkenhead et al., vyvinuli techniku PCR založenou na primerech odvozených z genu *flaA* kódující flagelin. Štěpení amplikonů *C. jejuni* pomocí *Alu I* prokázalo značný polymorfismus v délce restričních fragmentů [101]. Metody PCR jsou poměrně citlivé, avšak v závislosti na druhu vzorku se mohou objevit určité problémy. V potravinách v životním prostředí se vyskytují jednotlivé druhy bakterií v malém zastoupení a je proto nezbytné provádět nabohacování vzorku, čímž se ztrácí výhoda přímé detekce patogenu ve vzorku. Vzorky mohou obsahovat inhibitory řetězové polymerasové reakce, což vyžaduje zavedení dodatečných purifikačních postupů [98]. Určitou nevýhodou je i skutečnost, že řada laboratoří vyvinula vlastní specifické postupy, které však znesnadňují přenositelnost výsledků mezi laboratořemi.

6. Metody identifikace a charakterisace kampylobakterií

6.1 Fenotypové testy

Identifikace a diferenciaci kampylobakterií je poměrně obtížná, vzhledem k tomu, že jsou tyto bakterie náročné na růstové podmínky a nefermentují sacharidy. Většina identifikačních a rozlišujících fenotypových testů je založena na vyhodnocení morfologických znaků, nutričních požadavcích, rezistenci mikroorganismu k různým druhům agens včetně antibiotik, teplotní toleranci a na poměrně malém počtu biochemických (enzymových) testů [102, 103]. Např. *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari* jsou oxidasa a katalasa pozitivní, redukují dusičnany na dusitany, rostou za mikroaerofilních podmínek při teplotě 42 °C, avšak nikoli při 25 °C. Druh *C. lari* je rezistentní k nalidixové kyselině, *C. jejuni* a *C. coli* jsou na přítomnost tohoto antibiotika citlivé. Hydrolysa hippurátu je standardní test pro rozlišení *C. jejuni* od *C. coli* a *C. lari* [104, 105]. Diferenciaci *C. jejuni* subsp. *jejuni* a *C. jejuni* subsp. *doylei* je založena na schopnosti prvně jmenovaného poddruhu redukovat dusičnany a seleničitany. Odlišit *C. fetus* od běžně se vyskytujícího druhu *C. sputorum* ve veterinárních vzorcích je možné pomocí rychlého testu na důkaz produkce H₂S. Diferenciaci *C. fetus* subsp. *fetus* a *C. fetus* subsp. *veneralis* se provádí na základě schopnosti mikroorganismu tolerovat přítomnost 1 % glycerolu v růstovém médiu. Další doplňkovou a jednoduchou metodou jak rozpoznat oba poddruhy je stanovení jejich sérotypu. *C. fetus* subsp. *fetus* tvoří 2 sérotypy (A nebo B), zatímco *C. fetus* subsp. *veneralis* tvoří jediný sérotyp A [106]. Přestože biochemické testy poskytují rychlé údaje pro předběžnou identifikaci i subtypisaci kampylobakterií je třeba získané výsledky obezřetně vyhodnotit vzhledem k určité variabilitě v interpretaci a reprodukovatelnosti jednotlivých testů. Tyto rozdíly mohou být způsobeny velikostí inokula, typem kultivačního média způsobem provedení biochemických testů, tj. použitými reakčními podmínkami popř. stářím kultury [107-109]. Další problém představují mutatiní kmeny daného druhu, jako je např. hippurát negativní *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* [110].

Problémy spojené se s nejednoznačnými výsledky při vyhodnocování fenotypových charakteristik kampylobakterií vedly některé pracovníky k vývoji standardizovaných postupů, které by umožnily objektivní vyhodnocení získaných dat. Bolton et al., navrhl dvanáct fenotypových testů, jejichž výsledky umožní uživateli vypočítat numerický kód. Ten pak usnadňuje identifikaci 6 druhů rodu *Campylobacter* [111]. Malý počet rozpoznávaných druhů je největším omezením využitelnosti takto navrženého systému. Byly rovněž vypracovány pravděpodobnostní tabulky pro identifikaci kampylobakterií. Barrett et al., popsal výsledky studia 205 kmenů kampylobakterií pomocí 24 fenotypových testů [112]. Kombinace standardizovaných fenotypových testů v podobě miniaturizovaných komerčně dostup-

ných souprav a pravděpodobnostních tabulek pro přesnou identifikaci kampylobakterií pak představuje možnost jak usnadnit charakterisaci těchto mikroorganismů, omezit možnost chybné identifikace a jak zabezpečit přenositelnost výsledků mezi laboratořemi. Pravděpodobnostní tabulky je možné snadno revidovat v případě taxonomických změn, v okamžiku, kdy jsou pro nový taxon k dispozici porovnatelné údaje.

V současné době platná norma ČSN ISO 10272-1 *Mikrobiologie potravin a krmiv – horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Campylobacter spp.* požaduje pro identifikaci a další charakterisaci kampylobakterií následující fenotypové a biochemické testy: vyhodnocení morfologie mikroorganismu, pohyblivost, růst při teplotě 25 °C za mikroaerofilních podmínek, růst při teplotě 41,5 °C za aerofilních podmínek, průkaz cytochromoxidasy a katalasy, citlivost mikroorganismu k cefalotinu a kyselině nalidixové, schopnost hydrolyzovat hippurát a indoxylacetát. Růstové podmínky a definovaný soubor identifikačních testů umožňují rozlišit čtyři klinicky nejvýznamější druhy termofilních kampylobakterií (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* a *C. upsaliensis*).

6.2 Serologické testy

Serotypisace je jedna z běžných metod detailní fenotypové charakterisace bakterií. Pro kmeny *C. jejuni* a *C. coli* bylo navrženo několik serotypizačních schémat. Penner a Hennessy vyvinuli pasivní hemaglutinaci založenou na interakci rozpustných, tepelně stabilních antigenů, imobilizovaných na povrch erythrocytů se specifickými antiséry [113]. V současnosti je pomocí této metody popsáno 66 sérotypů. Hlavní antigenní komponentou jsou lipopolysacharidy, avšak některé studie naznačují, že se imunochemické reakce účastní také kapsulární polysacharidy [114, 115]. Penerova metoda serotypisace má dva nedostatky: 1) detekčním systémem je pasivní hemaglutinace, přičemž reprodukovatelnost výsledků může být ovlivněna variabilní kvalitou jednotlivých šarží erythrocytů [116], 2) v metodě se používají heterologními kmeny nesycená antiséra, takže značný počet isolátů aglutinuje s více jak jedním antiserem. [117]. Frost et al., modifikovali Pennerovo serotypizační schéma *C. jejuni* a *C. coli* použitím syčených antiser proti tepelně stabilnímu antigenu a využitím přímé aglutinace bakteriálních buněk jako detekčního systému [118]. Oba uvedené systémy jsou, vzhledem k různému způsobu přípravy protilátek a metodologii, srovnatelné pouze částečně.

Lior et al., navrhli serotypizační metodu založenou na protilátkách proti tepelně labilnímu antigenu a na přímé sklíčkové agglutinaci [119]. Vakcinace králíků byla prováděna bakteriálními buňkami ošetřenými 0,5 % formaldehydem. Nežádoucí křížové interakce protilátek byly potlačeny syčením antiser příslušnými heterologními kmeny. Kahlich et al., připravili specifická antiséra vakcinací králíků živými kulturami *Campylobacter jejuni*. Jako detekční systém byla použita přímá sklíčková aglutinace. Titr antiser se pro

homologními kmeny *C. jejuni* pohyboval v rozmezí 1:128 až 1:2048. Heterologní kmeny většinou v přítomnosti séra neaglutinovaly, pokud byly křížové interakce pozorovány, tak pouze při velmi nízkých titrech 1:4. Křížové reakce tak bylo možné potlačit ředěním séra v poměru 1:8 a více. Autoři definovali 25 sérotypů *C. jejuni* a vyslovili předpoklad, že aglutinačním agens je flagelin [120, 121]. Určitým nedostatkem serotypisace podle Kahliche je skutečnost, že metoda nedoznala většího rozšíření, a že nebyly uveřejněny konverzní tabulky s již dříve zavedenými technikami.

6.3 Molekulárně biologické metody identifikace a charakterisace kampylobakterií

Byla popsána řada molekulárně biologických technik pro identifikaci a další charakterisaci kampylobakterií. Většina těchto metod je založena na technice PCR. Tyto metody byly obvykle vyvinuty pro přímou detekci mikroorganismu s různou úrovní rozlišení. Harmon et al., vyvinuli multiplexovou metodu PCR (MPCR) pro simultánní detekci *C. jejuni* a *C. coli*. Byly aplikovány primery cílového genu *flaA* kódující flagelin a primery C1 a C4 proti blíže nespecifikovanému genu použité k identifikaci *C. jejuni*. Amplifikace DNA *C. jejuni* poskytovala 2 amplikony o velikosti 160bp a 460 bp, zatímco amplifikace DNA *C. coli* poskytla amplikon o velikosti 460 bp. [122] Person a Olsenová vyvinuli MPCR pro rutinní detekci *C. coli* a *C. jejuni*. Cílovým genem použitých primerů byl gen *hipO* kódující hippuricasu (*C. jejuni*) a sekvence částečně pokrývající gen *asp* kódující aspartokinasy (*C. coli*) Citlivost metody byla závislá na způsobu přípravy testovaného materiálu (klinické vzorky) a na způsobu extrakce templátové DNA. Detekční limit se tak pohyboval v rozmezí 10^2 - 10^5 buněk ml⁻¹ vzorku [123]. Jiná skupina vyvinula PCR pro souběžnou identifikaci *C. jejuni* a *C. coli*, s využitím primerů komplementárních k cílovému genu *ceuE* (*C. coli*) a genu kódujícímu oxidoreduktasu (*C. jejuni*) [124]. Yamazaki-Matsume popsali MPCR pro identifikaci *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari* a *C. upsaliensis*. Autoři použili kombinaci 6 druhově specifických primerů. Cílovými geny byly gen pro 23S rRNA (*C. hyointestinalis*), *ask* (*C. coli*), *cstA* (*C. fetus*), *glyA* (*C. lari*), *cj414* (*C. coli*) a *lpxA* (*C. upsaliensis*). Amplikony získané pro jednotlivé druhy byly jednoznačně rozlišitelné podle své velikosti po elektroforetické separaci na agarosovém gelu. Účinnost metody byla ověřena na 142 kmenech kampylobakterií různého původu [125]. Rovněž byla popsána real-time PCR pro přímou kvantifikaci *C. jejuni* a *C. lanienae* ve veterinárních vzorcích. Pro *C. jejuni* byl použit primer komplementární s genem *mapA*, pro *C. lanienae* byly testovány 3 primery komplementární k 16S rRNA. Detekční limit amplifikace *C. jejuni* byl $3 \cdot 10^3$ cfug⁻¹, detekční limit amplifikace *C. lanienae* dosáhl hodnoty 250 cfug⁻¹ [126]. Dionisi et al. použili real-time PCR k identifikaci ciprofloxacin resistantních kmenů *C. jejuni*. Autoři použili primery komplementární s úsekem cílového genu *gyrA*, protože substituce CT

na 86 kodonu tohoto genu je spojována s resistencí k ciprofloxacinu [127]. Hong et al., vyvinuli PCR-ELISA pro rychlou detekci *C. coli*, *C. jejuni* a *Salmonella enterica* v kuřatech. V této metodě jsou do amplikonu začleněny značené nukleotidy a výsledný PCR produkt je detekován použitím komplexu enzym-protilátka, která rozpoznává použitou unikátní značku. Detekční limit metody pro průkaz přítomnosti salmonel byl 210^2 cfu ml⁻¹, detekční limit pro průkaz přítomnosti kampylobakterií činil 410^1 cfu ml⁻¹ [128].

Studer et al., testovali vzorky z životního prostředí z kuřecích farem na přítomnost kampylobakterií. Vzorky byly analysovány jak kultivační metodou, tak pomocí PCR. Všechny produkty PCR byly dále typovány na základě analýsy délkového polymorfismu restrikčního fragmentu (RFLP), s využitím restrikční endonukleasy *DraI*. Byly nalezeny 3 RFLP profily a jejich vzájemné kombinace [129]. Vacherová et al. vyvinuli kombinovanou techniku založenou na PCR a RFLP pro detekci bodových mutací odpovědných za resistenci kampylobakterií k makrolidům [130].

Pro subtypisaci kampylobakterií byly použity i další metody, jako je makrorestrikční profilování pomocí pulsní elektroforezy (PFGE) [131-134], *flaA* typisace [132], náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD) [62, 135, 136] a ribotypisace [133, 137]. Sekvenování genomu *C. jejuni* usnadňuje zavádění technologie mikročipů, která je založena na umístění vysokého počtu

specifických DNA sond na velmi malé ploše, což umožňuje testovat velký počet vzorků, s minimální spotřebou výchozího materiálu a reagentů [138, 139].

6.4 Ostatní metody

Byla popsána řada specifických bakteriofágů a jejich využití pro detailní charakterisaci kmenů *C. jejuni* a *C. coli* [140, 141, 142]. Kombinace metod serotypisace a fagotypisace byla použita ve Velké Británii při charakterisaci 2407 kmenů *C. jejuni* a 182 kmenů *C. coli* [143]. Wareing et al. použili serotypisaci podle Pennera, fagotypisaci za použití 16 lytických bakteriofágů a biotypisaci ke studiu fenotypové diversity 831 kmenů kampylobakterií získaných ze sporadických infekcí v různých geografických oblastech Velké Británie. Isoláty *C. jejuni* byly rozděleny do 40 fagotypových skupin přičemž 16 skupin se vyskytovalo s frekvencí větší než 1 %. Celkem 17,9 % isolátů nebylo typovatelných. Nejfrekventovanější fagotypy (PG52, PG121 a PG55) byly přiřazeny k nejčastěji se vyskytujícím sérotypům O:1, O:2 a O:4 [144].

Méně běžnými metodami identifikace a charakterisace kampylobakterií je analýza profilů buněčných mastných kyselin [145-148], studium proteinových profilů lysovaných buněk [149, 150], popř. měření molekulové hmotnosti druhově specifických proteinových biomarkerů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF [151, 152].

7. Literatura

1. Bryan F.L., Doyle M.P.: *J. Food Protect.*, 58, 326-344 (1995).
2. Jimenez A., Velazquez J.B., et al.: *J. Infect.*, 29, 305-310 (1994).
3. Anonym: *The EFSA Journal*, 130, 353 pages (2007).
4. Tunnicliff R.: *J. Infect. Dis.*, 15, 350-351 (1914).
5. Prévot A.R.: *Annal.Inst. Pasteur (Paris)*, 64, 117-125 (1940).
6. Smith T.: *J. Exp. Med.*, 28, 701-705 (1918).
7. Smith T., Taylor M.S.: *J. Exp. Med.*, 30, 299-311 (1919).
8. Jones F.S., Little R.B.: *J. Exp. Med.*, 53, 835-851 (1931).
9. Doyle L.P.: *Am. J. Veter. Res.*, 5, 3-5 (1944).
10. Vincent R., Dumas J., Picard N.: *Bul.Acad. Nat. Méd. Paris*, 131, 90-93 (1947).
11. King E.O.: *J. Infect. Dis.*, 101, 119-128 (1957).
12. Sebald M., Véron M.: *Annal.Inst. Pasteur (Paris)*, 105, 897-910 (1963).
13. Véron M., Chatelain R.: *Inter. J. System. Bacteriol.*, 23, 122-134 (1973).
14. Vandamme P., De Ley J.: *Inter. J. System. Bacteriol.*, 41, 451-455 (1991).
15. Amano K., Shibata Y.: *Microbiol. Immunol.*, 36, 961-967 (1992).
16. Goodhew C.F., Elkurdi A.B., Pettigrew G.W.: *Bioch. Biophys. Acta*, 933, 114-123 (1988).
17. Harvey S., Lascelles J.: *J. Bacteriol.*, 144, 917-922 (1980).
18. Carlone G.M., Lascelles J.: *J. Bacteriol.*, 152, 306-314. (1982).
19. Moss C.W., Kai A., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 19, 772-776 (1984).
20. Moss C.W., Lambert-Fair M.A., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 28, 395-397 (1990).
21. Vandamme P., Daneshvar M.I., et al.: *Int. J. System. Bacteriol.*, 45, 145-152 (1995).
22. Blaser M.J., Wels J.G., et al.: *Ann. Int. Med.*, 98, 360-365 (1983).
23. Rao G.G., Fuller M.: *J. Hosp. Infect.*, 20, 105-111 (1992).
24. Blaser M.J., Berkowitz I.D., et al.: *Ann. Int. Med.*, 91, 179-185 (1979).
25. Pitkanen T., Pönkä A., et al.: *Arch. Int. Med.*, 143, 215-219 (1983).
26. Karmali M.A., Fleming P.C.: *J. Pediat.*, 94, 527-533 (1979).
27. Ashkenazi S., Danziger Y., et al.: *Archiv. Disease Childhood*, 62, 84-85 (1987).
28. Chan F.T.H., Stringel G., Mackenzie A.M.R.: *J. Clin. Microbiol.*, 18, 422-424 (1983).
29. Megraud F., Tachoire C., et al.: *Brit. Med. J.*, 285, 1165-1166 (1982).

30. Lambert M.E., Schofield P.F., et al.: *Brit. Med. J.*, **1**, 857-859 (1979).
31. Price A.B., Jewkes J., Sanderson P.J.: *J. Clin. Pathol.*, **32**, 990-997 (1979).
32. Ashworth J., English J.S.C.: *Brit. Med. J.*, **288**, 830 (1984).
33. Eastmond C.J., Reid T.M.S.: *Brit. Med. J.*, **285**, 1421-1422 (1982).
34. Michalak D.M., Perrault J., et al.: *Gastroenterology*, **79**, 742-745 (1980).
35. Molina J.-M., Casin I., Hausfater P., et al.: *AIDS*, **9**, 881-885 (1995).
36. Jakson N., Zaki M., Rahman A.R., et al.: *J. Clin. Pathol.*, **50**, 436-437 (1997).
37. Meyrieux V., Monnaret G., et al.: *Clin. Infect. Diseases*, **22**, 183-184 (1996).
38. Korman T.M., Varley C.C., Spelman D.W.: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Diseases*, **16**, 678-681 (1997).
39. De Bois M.H.W., Shoemaker M.C., et al.: *Brit. Med. J.*, **298**, 1004 (1989).
40. Dakdouki G.K., Araj G.F., Hussein M.: *Clin. Microbiol. Infection*, **9**, 970-972 (2003).
41. Simor A.E., Karmali M.A., et al.: *Rev. Infect. Diseases*, **8**, 397-402 (1986).
42. Denton K.J., Clarke T.: *J. Clin. Pathol.*, **45**, 171-172 (1992).
43. Moscuna M., Gross Z., et al.: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Diseases*, **8**, 800-801 (1989).
44. Chamowitz B.N., Hartstein A.I., et al.: *Pediatrics*, **71**, 253-256 (1983).
45. Schaad U.B.: *Pediatric Infect. Disease J.*, **1**, 328-332 (1982).

Další literatura u autorů.

Souhrn

Kampylobakterie jsou běžně se vyskytující mikroorganismy, způsobující infekce u člověka a zvířat. Enteritis způsobená kampylobakteriemi se projevuje průjmy, horečkami a bolestmi břicha. Ačkoliv onemocnění obvykle nevyžaduje lékařské ošetření, infekce může vzácně vést k závažným zdravotním následkům, jako je reaktivní artritida a Guillain-Barré syndrom. Pathogen se běžně vyskytuje v životním prostředí a potravinách, jak rostlinného tak živočišného původu. Tento nástin je zaměřen na současné metody izolace, identifikace a charakterisace klinicky významných kampylobakterií.

klíčová slova: *Campylobacter*, gastroenteritis, Guillain-Barré syndrom, fenotypisace, serotypisace, genotypisace

Abstract

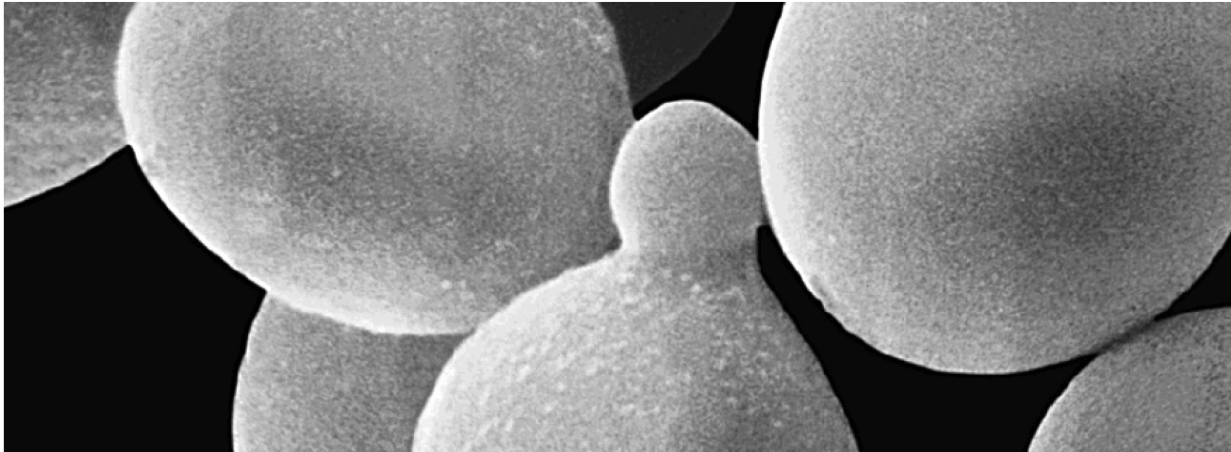
Campylobacters are ubiquitous microorganisms responsible for infections in humans and animals. An enteritis caused by campylobacters is characterized by diarrhoea, fever and abdominal pain. Although, it is usually self-limiting disease that does not require antimicrobial therapy, the infection can rarely lead to the serious sequelae such as reactive arthritis and Guillain-Barré syndrome. The pathogens are frequently found in an environment and many foods, of both animal and plant origin. This outline is focused on recent methods used for isolation, identification and characterization of clinically important *Campylobacter* species.

key words: *Campylobacter*, gastroenteritis, Guillain-Barré syndrome, phenotyping, serotyping, genotyping



Zurich University
of Applied Sciences

**Life Sciences and
Facility Management**



joint BioTech 2008 and 4th Swiss-Czech Symposium

Biopharmaceuticals: why use yeasts?

22 – 23 May 2008

Join experts from industry and academia to share experience on advanced yeast expression systems and to identify new application fields, tools and process innovations.

Zurich University of Applied Sciences ZHAW, Campus Grüental, Wädenswil, Switzerland

As the number of places is limited, early registration is recommended!

**www.biotech2008.ch
www.swiss-czech.net**

Zürcher Fachhochschule

OBSAH

Káš J.: Úvodem	1
Pozvánka na seminář Novinky v genetických modifikacích	1
Pudová L.: Brusel hostil brněnské univerzitní projekty	2
Jiráková H., Večeřa M.: Český informační systém Cartagenského protokolu o biologické bezpečnosti	4
Vaněk T.: Technologický profil ČR	6
Křístková M.: Geneticky modifikované plodiny v zemědělství ČR – Bt kukuřice	8
Drobník J.: České stanovisko k regulaci zelené biotechnologie	12
Káš J., Demnerová K.: Problematika GMO na 13. mezinárodním biotechnologickém sympoziu	16
Rajnoch J.: Založení zájmového sdružení právnických osob CzechBio	20
Hynek R.: Transmembránové proteiny – výzva pro hledání nových analytických přístupů	22
Píterková L.: Moderní metody identifikace bakterií	24
Marounek M., Dušková D.: Metabolismus pektinu u anaerobních bakterií z trávicího traktu	24
Hochel I. a Matúšová M.: Isolace, detekce a charakterisace <i>Campylobacter</i> sp.	24

CONTENTS

Káš J.: Editorial	1
Invitation for the seminar News in genetic modifications	1
Pudová L.: University projects of the Moravian town Brno presented in Brussels	1
Jiráková H., Večeřa M.: Czech Biosafety Clearing House	1
Vaněk T.: Technological profile of the Czech republic	3
Křístková M.: Genetically modified crops in Czech republic – Bt corn	6
Drobník J.: Czech attitude to the regulation of green biotechnology	10
Káš J., Demnerová K.: GMO on 13th International Biotechnology Symposium	12
Rajnoch J.: Foundation of the Czech association of biotechnology companies and institutions – CzechBio	14
Hynek R.: Transmembrane proteins – call for searching new analytical approaches	18
Píterková L.: Recent methods of bacteria identification	20
Marounek M., Dušková D.: Metabolism of pectin in anaerobic bacteria isolated from the digestive tract	22
Hochel I., Matúšová M.: Isolation, detection and characterisation of <i>Campylobacter</i> sp.	24

POKYNY PRO AUTORY

Vážení přátelé,
aby byla technická úprava našeho časopisu co nejlepší a s minimálním množstvím chyb, uvítali bychom dodržování některých dále uvedených zásad.

1. Texty zasílejte elektronickou formou jako "attachment" spolu s tištěnou verzí, aby bylo možno opravit chyby způsobené přenosem. Na konci článku uveďte **krátký souhrn** a klíčová slova. A to česky a **anglicky**.
2. Texty píše v editoru **WORD** (formát .doc), písmo **Arial**, velikost 11. Zarovnání do bloku, styl **NORMÁLNÍ**, nečíslovat stránky. Nerozdělujte slova na konci řádků. V textu lze používat zvýraznění některých termínů tučným písmem či kurzívou, a také horní a dolní index. Řádkování jednoduché. Odsazení odstavců a mezery mezi nimi nepoužívejte (nastavení = 0).
3. **Nepoužívejte** automatické číslování, tabulátory, ani „tvrdé“ definice stránek.
4. **CITACE** v textu uvádějte pouze číselným odkazem. Rozsah seznamu literatury nesmí být disproporční k rozsahu článku. Citace ve zkrácené formě **bez názvu práce**, pouze první 3 autory + et al., časopis oficiální zkratkou a Volume, 1. strana (Rok).
Např. Heath WR, Galli C, Smith JS, et al.: Appl Environ Microbiol 71, 182 (2005).
5. Obrázky zasílejte **zásadně zvlášť** v některém z běžných formátů (.jpg, .tif).
6. Připojte vždy svojí e-mailovou adresu či číslo telefonu, aby případné problémy bylo možno rychle řešit.

BIOTECHNOLOGICKÁ
SPOLEČNOST
166 28 Praha 6, Technická 3

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

Podávání novinových zásilek povoleno Ředitelstvím pošt Praha, čl. NP 1177/1994 ze dne 13. 6. 1994